

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Detección de genes productores de biofilm en aislados de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* provenientes de Hospitales de Quito y Puyo**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIATURA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ANDRÉS SANTIAGO SANGUANO MANTILLA**

**Quito, 2020**



Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Andrés Santiago Sanguano Mantilla ha sido concluida en conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Directora de la disertación

Quito, 2 de septiembre de 2020

“If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants.”

Issac Newton

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida. Cada uno ha aportado algo que ahora forma parte de mí y me hacen una mejor persona.

A mi hermano le agradezco por haber cuidado siempre de mí y especialmente le quiero agradecer por haber sido mi Mecenaz, ya que sin él no podría haber estudiado esta hermosa carrera y otros cursos que no solo me enriquecen académicamente, si no que forman parte de lo que me gusta hacer en la vida.

A mis amigos Livardi, Danny, Daniel, Heisel, Ricardo, Duncan, Camilo, Esteban, Nastia, Mateo y David por haber sido mis consejeros cuando más lo necesitaba, además de ser mis fuentes de inspiración para seguir adelante y cumplir con mis metas.

A todas las personas pertenecientes al Laboratorio de Microbiología, especialmente a Francisco y a la Mtr. María Fernanda Yauri que han sabido apoyarme con sus conocimientos.

A la Dra. Iliana Alcocer por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología y haberme dado la oportunidad de formar parte de los proyectos, en los que pude aprender mucho y cumplir con mi disertación. Además, de permitirme ser parte de la familia que conforma el laboratorio y vivir muchos lindos momentos con ellos.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por haber financiado esta investigación en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas.

Finalmente quisiera agradecer a los docentes de la carrera de Biología, ya que a través de sus enseñanzas y experiencias me inspiraron para seguir adelante en el camino de la investigación científica.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 OBJETIVOS.....	7
3.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	8
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN .....	9
4.3 PRUEBAS FENOTÍPICAS .....	9
4.4 PRUEBAS GENOTÍPICAS.....	10
5. RESULTADOS .....	14
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	14
5.2 PRUEBAS FENOTÍPICAS .....	17
5.3 PRUEBAS GENOTÍPICAS.....	21
5.4 COMPARACIÓN DE LOS FENOTIPOS CON GENOTIPOS.....	29
6. DISCUSIÓN .....	34
7. CONCLUSIONES.....	40
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
9. ANEXO.....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patrón colorimétrico reconocido en las muestras colectadas. ....	18
Figura 2. Número de fenotipos observados en las placas de agar rojo Congo en la población. ....	19
Figura 3. Porcentaje de fenotipos positivos a la prueba de producción de biofilm en agar rojo Congo por cada especie. ....	20
Figura 4. Número de aislados positivos a la prueba de formación de biofilm en medio agar rojo Congo por hospital de estudio. ....	19
Figura 5. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen <i>icaA</i> en <i>S. epidermidis</i> . ....	21
Figura 6. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen <i>icaB</i> en <i>S. epidermidis</i> . ....	22
Figura 7. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen <i>icaC</i> en <i>S. epidermidis</i> . ....	22
Figura 8. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen <i>icaD</i> en <i>S. epidermidis</i> ....	23
Figura 9. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen <i>icaA</i> en <i>S. aureus</i> . ....	23
Figura 10. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen <i>icaD</i> en <i>S. aureus</i> . ....	24
Figura 11. Porcentaje de aislados positivos a la presencia de genes <i>ica</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por especie. ....	28
Figura 12. Número de aislados positivos a la presencia de genes <i>ica</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por hospitales ....	29

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1.	Cebadores utilizados para la detección de los genes productores de biofilm en <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	12
Tabla 2.	Cebadores utilizados para la detección de los genes productores de biofilm en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
Tabla 3.	Lista de aislados colectados, su origen y tipo de muestra, de los tres hospitales en orden de registro en la base de datos de la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA.....	14
Tabla 4.	Resultados de presencia y ausencia de genes <i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> , <i>icaD</i> y lecturas en placas de agar rojo Congo .....	25
Tabla 5	Comparación de presencia y ausencia de biofilm entre las pruebas fenotípicas con agar rojo Congo y las genotípicas con reacción de cadena de la polimerasa .....	30

## LISTA DE ANEXOS

Tabla 1. Escala de patrón colorimétrico para la evaluación de agar rojo Congo .....	49
Tabla 2. Mecanismo de activación e inhibición de biofilm ica-dependiente en Estafilococos.....	50

## 1. RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es considerado uno de los principales patógenos responsables de las infecciones comunitarias y relacionadas con el cuidado de la salud. La terapia de las infecciones estafilocócicas enfrenta muchas dificultades, no solo por la resistencia de la bacteria a los antibióticos y la multiplicidad de factores de virulencia que produce, sino también por su capacidad para formar biofilm. Del mismo modo, las infecciones causadas por *Staphylococcus epidermidis* en los hospitales son cada vez más frecuentes, sobre todo en contaminación de instrumentos quirúrgicos y en pacientes con el sistema inmune comprometido. El biofilm es producido por el locus *ica* que cuenta con cuatro genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*. El objetivo del estudio fue detectar la presencia de los genes *ica*, responsables de la producción de biofilm, en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se analizaron 99 aislados clínicos de *S. aureus* y *S. epidermidis* provenientes de dos hospitales de tercer nivel en las ciudades de Quito y el Puyo, y una cepa control American Type Culture Collection de *S. aureus* ATCC® 25923. Las bacterias formaron parte de la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA). Los aislados fueron cultivados en manitol salado y al día siguiente en agar rojo Congo (CRA), para determinar su capacidad de producir biofilm. Fueron identificados seis fenotipos siguiendo la escala colorimétrica patrón: muy rojo 11/100, rojo 35/100, rojo oscuro 25/100, casi negro 3/100, negro con 16/100 y muy negro 10/100. Se identificó la presencia de los genes del locus *ica* en cada bacteria y se obtuvo un 70,0% positivos para *icaA*, 35% positivos para *icaB*, 26,0% positivos para *icaC* y 66,0% positivos para *icaD* a través de PCR con cebadores específicos para cada gen. Al comparar los resultados del CRA con la confirmación con PCR, se observó que la técnica de agar rojo Congo no es 100% efectiva para determinar si los aislados son capaces de producir biofilm, ya que se identificaron aislados que presentaron los fenotipos negativos para la producción de biofilm (muy rojo, rojo y rojo oscuro) pero tenían uno o más de los genes *ica*.

**Palabras Clave:** agar rojo Congo, biofilm, estafilococos, factores de virulencia, genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*

## 2. ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is considered one of the main pathogens responsible for hospital and community related infections. The therapy for these staphylococcal infections faces many difficulties, not just for antibiotic resistance and a variety of virulence factors, but for its capacity to produce biofilm. Similarly, infections caused by *Staphylococcus epidermidis* are more frequent, especially in surgical instrumentation and with patients with a compromised immune system. Biofilm is produced by the locus *ica* which have four genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*. The objective of this study was to detect the presence of the *ica* genes, responsible for the biofilm production in clinic isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by polymerase chain reaction (PCR). Ninety-nine clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* from two third level hospitals in Quito and Puyo were analyzed, as well as a control strain of *S. aureus* from the American Type Culture Collection. The isolates were registered in the Bacterial Collection Quito Católica (CB-QCA). The isolates were cultured in Mannitol Salt and the next day into Congo Red Agar (CRA), to determine if the isolates can produce biofilm. Six phenotypes were obtained following the colorimetric pattern and were identified: very red 11/100, red 35/100, dark red 25/100, almost black 3/100, black 16/100 and very black 10/100. The presence of the genes from the locus *ica* was identified in each isolate and the 70,00% was positive for *icaA*, 35,00% positive for *icaB*, 26,00% positive for *icaC* and 66,00% positive for *icaD* by PCR, using specific primers for each gene. When the results of the CRA and the PCR were compared, it was observed that the CRA is not 100% effective to determine if the isolates can produce biofilm, since there were isolates which showed negative phenotypes for biofilm production (very red, red, dark red) but they possessed some of the *ica* genes.

**Keywords:** biofilm, Congo red agar, genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, staphylococci,

### 3. INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus* es un género de bacterias Gram positivas que se caracterizan por ser anaerobios facultativos, inmóviles, no esporulados, catalasa positivos y fermentadores de glucosa. Estas bacterias son consideradas comensales, ya que se encuentran en la piel y en las membranas mucosas del humano (Kleinschmidt, Huygens, Faoagali, Rathnayake y Hafner, 2015). Su nombre proviene de los vocablos griegos *staphyle* (racimo de uvas) y *kokkus* (baya), ya que describe la forma en la que estas bacterias se ven bajo el microscopio (Pahissa, 2009). Las colonias en medio sólido como el agar nutriente son, comúnmente, redondas, de borde liso, convexas y con superficie brillante (Rodríguez, Gamboa, Hernández y García, 2006).

Las bacterias de este género se pueden separar en dos grupos basándonos en la capacidad de algunas especies para producir coagulasa: las bacterias coagulasa positivas, como *S. aureus*, y coagulasa negativas, como *S. epidermidis* (Granslo, 2012). Dentro de ambos grupos, las especies de mayor importancia médica son *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, aunque otras especies son potencialmente capaces de producir un cuadro patológico (Rodríguez et al., 2006).

La identificación de las bacterias dentro del género tradicionalmente es mediante pruebas de tinción Gram, descripción de la morfología, catalasa, oxidasa, metabolismo anaerobio/fermentativo, etc. (Koneman y Allen, 2008). El método más usado para la identificación de *S. aureus* y *epidermidis* es en agar de manitol salado, ya que su alta concentración de sal inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y presenta una coloración distintiva para diferenciar a estas dos especies (Pahissa, 2009).

*Staphylococcus aureus* es considerado uno de los principales patógenos responsables de las infecciones comunitarias y relacionadas con el cuidado de la salud (Jaśkiewicz, Janczura, Nowicka y Kamysz, 2019). Es una bacteria muy resistente al calor, la desecación y puede crecer en condiciones de alta salinidad.

Esto facilita que el 20% de la población sea portadora permanente de esta bacteria en fosas nasales y el 60% actúan como portadores intermitentes (Carr, Daley, Givens, Merkel y Rose, 2018).

Es común aislar *S. aureus* en casos de bacteriemia de países industrializados. Estas tienen una incidencia de 15 a 40 casos por cada 100.000 personas. Además, se relacionan con tasas de letalidad del 15 al 25% (Vogel et al., 2016). Según Zecconi y Scali (2013), en Estados Unidos es considerada una de las principales causas de muerte. Hasta el 2013 se registró 18.000 muertes por año, 290,000 hospitalizaciones y cerca de 12 millones de visitas médicas. En estudios recientes en el mismo país, Kourtis et al. (2019) estimaron que hasta el 2017 hubo 119.247 casos de personas que sufrieron de infecciones al torrente sanguíneo por *S. aureus* y cerca de 19,832 muertes. Lo que nos indica que el número de casos continúa persistiendo a pesar del tiempo y los esfuerzos para combatir este tipo de infecciones.

Uno de los factores que complican el tratamiento de infecciones estafilocócicas son los factores de virulencia que estas pueden poseer. Estos elementos le confieren a la bacteria la capacidad de ser más patogénica u obtener una ventaja de supervivencia. Las principales toxinas que le brindan a *S. aureus* su patogenicidad son: la toxina de shock tóxico, coagulasa, toxinas citolíticas, toxinas exfoliativas y la leucocidina de Panton-Valentine (Ji, 2007). Debido a ellas, *S. aureus* puede causar distintas enfermedades dependiendo del sitio de infección. Entre las principales están: endocarditis, fibrosis, neumonía necrotizante, shock tóxico y sepsis (Lim et al., 2015).

Actualmente, el factor más importante en el tratamiento de estas infecciones es la capacidad que tiene esta bacteria para adquirir resistencias a los antibióticos. En el año 1960 se describió la cepa de *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA, por sus siglas en inglés), el  $\beta$ -lactámico más efectivo contra la mayoría de las cepas de *S. aureus* hasta la época (Panlilio et al. 1992). Estas cepas de MRSA estaban inicialmente relacionadas a infecciones adquiridas en hospitales (HA-MRSA) y a mediados de los noventa se comenzó a encontrar cepas resistentes en la

comunidad (CA-MRSA), con gente que no ha tenido contacto con el sistema de salud (David y Daum, 2017).

Debido a la dispersión de estas cepas de MRSA se buscaron tratamientos alternativos usando Vancomicina, Daptomicina y Linezolid (Haaber, Penadés y Ingmer, 2017). Pero actualmente, existen cepas con resistencia intermedia o completamente resistentes a estos antibióticos (Wei et al., 2018; Roch et al. 2017). La Organización Mundial de la Salud desde el año 2017 ha incluido a *Staphylococcus aureus* en la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Se encuentran en la categoría 2: Elevada, ya que presentan una farmacoresistencia creciente (Tacconelli et al., 2018; Organización Mundial de la Salud, 2019).

Estas bacterias multirresistentes se dispersan rápidamente por el mundo debido al uso indiscriminado o frecuente de los antibióticos, aumentando el riesgo y los costos de los tratamientos (Zaman et al., 2017). Dentro de los casos de hospitales reportados en Ecuador se registra una prevalencia del 25% de MRSA multirresistentes (Guzmán-Blanco et al., 2009).

*S. epidermidis* es una de las bacterias más comunes en la microbiota de la piel y la mucosa de los seres humanos. Esta es capaz de sobrevivir a altas concentraciones de salinidad y se diferencia principalmente de *S. aureus* porque esta carece de coagulasa (Otto, 2009). Esta bacteria actúa como probiótico, evitando la colonización de otras bacterias más patogénicas. En la piel *S. epidermidis* fermenta el glicerol en ácido butírico y ácido acético, los cuales inhiben la colonización de *S. aureus* (Traisaeng, Herr, Kao, Chuang y Huang, 2019)

En los últimos años se ha convertido en un patógeno frecuente, demostrando que tienen la habilidad de colonizar los nichos que un ambiente de hospital ofrece (Heilmann, Ziebuhr y Becker, 2019). Los factores que facilitan que *S. epidermidis* logre causar una infección son: un sistema inmune comprometido o inmaduro (Dong, Speer y Glaser, 2018), individuos que hayan pasado por intervenciones quirúrgicas (Kleinschmidt et al., 2015), presencia de dispositivos médicos permanentes que ofrecen una superficie de colonización (Oliveira et al., 2018)

El crecimiento de casos de *S. epidermidis* en infecciones de hospitales se debe a la producción de un biopolímero extracelular conocido como biofilm. Este protege a las bacterias contra el sistema inmune del huésped y sirve como barrera contra tratamientos antibióticos (Heilmann et al., 2019). Existen dos tipos de biofilm conocidos en estafilococos, la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA, por sus siglas en inglés) y el biofilm PIA independiente (Arciola, Campoccia, Ravaioli, y Montanaro, 2015).

El biofilm de tipo PIA o también conocido como poli-N-acetilglucosamina (PNAG) consiste de cadenas de poli- $\beta$ (1-6)-N-acetilglucosamina, un glicosaminoglicano lineal que proporciona la adhesión intercelular de células bacterianas (Arciola et al., 2015). Tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis*, el biofilm es codificado por el Operon *ica*, el cual consiste de cuatro genes (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*), que codifican transferasas y deacetilasas que producirán cadenas con monómeros de N-acetilglucosaminas, que al final crearán delgadas capas de biofilm (Heilmann et al., 2019).

El biofilm de tipo PIA independiente es generado por diversas proteínas como la proteína asociada a biofilm (Bap), la proteína asociada a la acumulación (Aap), generalmente asociadas a estafilococos coagulasa negativa. Otro tipo de proteínas de superficie como SasG, SasC, proteína A, proteínas de unión a la fibronectina, también contribuyen a la formación de este tipo de biofilm (Arciola et al., 2015).

La producción de biofilm depende de varios factores externos, como la presencia de etanol, isopropanol y NaCl (Luther, Bilida, Mermel y LaPlante, 2015). Otro factor regulador de la expresión de biofilm es el elemento transponible IS256, que se inserta en diferentes sitios del operon *ica*, inhibiendo la síntesis de biofilm en una cepa productora de biofilm. (Hennig y Ziebuhr, 2008). Este es un proceso reversible, ya que después de unas cuantas generaciones las cepas pueden volver a producir biofilm (Ziebuhr et al., 1999; Hennig y Ziebuhr, 2008). Por eso se cree importante comprobar la presencia de los genes, antes que basarse únicamente en las pruebas fenotípicas.

El estudio se centra en la búsqueda de bacterias productoras de biofilm tipo PIA, como un diagnóstico temprano que ayudaría a la prevención de complicaciones en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Los tratamientos deben adaptarse dependiendo a la complejidad del biofilm que produzcan las bacterias, ya que se necesitarán diferentes tipos de agentes dispersores, para que los antibióticos puedan actuar sobre las bacterias. Un riesgo de la dispersión del biofilm, es que las colonias que se desprenden colonicen otros órganos, por lo que se recomienda realizar terapias combinadas de agentes dispersores con drogas antimicrobianas sistémicas (Zapotoczna, O'Neill y O'Gara, 2016).

### **3.1 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia de los genes *ica*, responsables de la producción de biofilm, en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante reacción en cadena de la polimerasa.

#### **3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.1.2.1 Colectar aislados bacterianos en tres hospitales de Tercer nivel, dos en Quito y uno en el Puyo.

3.1.2.2 Realizar pruebas fenotípicas para verificar la producción de biofilm en los aislados colectados, con patrones colorimétricos obtenidos en agar rojo Congo.

3.1.2.3 Identificar la presencia de los genes *ica* por medio de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

3.1.2.4 Comparar la expresión fenotípica del biofilm con los datos de presencia y ausencia obtenidos en las reacciones de PCR.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio se realizó con aislados clínicos donados de dos hospitales de tercer nivel de la ciudad de Quito, uno al sur (Hospital 1) y otro en el centro (Hospital 2), y un hospital de tercer nivel de la ciudad del Puyo (Hospital 3), durante los meses de octubre del 2016 a mayo del 2017. Los aislados fueron procesados e identificados en los hospitales como *S. epidermidis* o *S. aureus* y se aislaron en placas de agar nutriente para su transporte al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Para el transporte, las placas fueron selladas con parafilm, guardadas en una funda de plástico resistente, y finalmente fueron colocadas dentro de un cooler, identificado con riesgo biológico, hasta el Laboratorio. Al estudio se le adjunto la cepa ATCC® de *Staphylococcus aureus* 25923 como referencia.

Los aislados obtenidos pasaron a formar parte de la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA) y se les fueron asignados con un código propio de la colección. Para su procesamiento, las bacterias fueron reaisladas en placas de agar manitol salado (BBL™ BD) para su identificación y prevenir contaminación.

El manitol salado es un medio de cultivo diferencial que permite el aislamiento de muestras clínicas y detección de *Staphylococcus aureus*. Este inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas, ya que tiene una concentración de 7,5% de cloruro sódico por litro. La diferenciación entre especies de estafilococos se debe al rojo de fenol, como indicador de pH, y a la fermentación del manitol. La fermentación del manitol produce ácidos que modifican el pH del medio, modificando el color del medio de rojo a amarillo. Las bacterias capaces de fermentar el manitol, como *Staphylococcus aureus*, se observan como colonias amarillas en un medio amarillo. Los estafilococos que no fermentan el manitol serán de color rojo o rosado (Laboratorios Britania, 2020)

Desde las placas de agar manitol salado se cultivaron a cada bacteria en agar nutriente dentro de tubos 10x120 mm con tapa de caucho hermética para la

bacterioteca CB-QCA a temperatura ambiente. Las mismas luego fueron cultivadas en 5 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés, BBL™ BD) a 37 °C por 18 horas. A cada tubo se le añadió 30% de glicerol, y se realizó 4 alícuotas de 1,5 mL en microtubos. Dos de las alícuotas fueron almacenadas a -20 °C y las otras 2 copias a -80 °C para formar parte de la bacterioteca de congelamiento.

#### **4.2 EXTRACCIÓN DE ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de los aislados conservados a -20 °C. Para su reactivación, las bacterias fueron cultivadas en caldo BHI (Difco™) durante 18-24 horas a 35 °C. Al día siguiente los aislados fueron sembrados en agar manitol salado (BBL™ BD) durante 18-24 horas a 35 °C. Finalmente, al tercer día se realizó una transferencia de los aislados obtenidos de la placa a caldo Tripticasa soya (TSB, por sus siglas en inglés) (Difco™) durante 18 horas a 35 °C. Con los cultivos en TSB se utilizó el kit comercial de extracción de ADN “Wizard® Genomic DNA Purification kit” (PROMEGA®) y se siguieron las indicaciones provistas por el fabricante; con la previa preparación de soluciones de EDTA (50mM) y Lizosima (10 mg/ml), reactivos empleados para la extracción de ADN de bacterias Gram positivas. La calidad y cantidad de ADN fue determinado con NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). El ADN extraído fue almacenado a -20 °C hasta su uso en las reacciones de amplificación por PCR.

#### **4.3 PRUEBAS FENOTÍPICAS**

Se realizaron pruebas en agar rojo Congo para determinar la expresión de biofilm. Para la preparación del agar rojo Congo se empleó: BHI agar (BBL™ BD), 0,8 g/l de rojo Congo (BDH Chemicals Ltd) y 36 g/l de glucosa; siguiendo el protocolo propuesto por Petrelli et al. (2006). A partir de los aislados obtenidos sobre las placas de Manitol Salado (BBL™ BD) se reaislaron los cultivos en placas de rojo Congo. La incubación fue durante toda una noche a 37 °C, seguido de 12 horas a temperatura ambiente para continuar con las lecturas. El rojo Congo cambia el color de las colonias ante la presencia de los polisacáridos producidos para la producción del biofilm. Si las bacterias producen biofilm, las colonias serán de color

negro. Los aislados que carezcan de esta capacidad serán de color rojo (Freeman, Falkiner y Keane, 1989). Se evaluaron los resultados según la coloración de las colonias en el medio, basándose en las escalas colorimétrica obtenidas en la publicación de Arciola et al., (2002), que consta de seis categorías: muy rojo, rojo, rojo oscuro, casi negro, negro y muy negro según se detalla en el Anexo 1, tomado de Arciola et al. (2002) y en la Figura 1 según lo detallado en este estudio. El criterio para separar cada categoría fue el siguiente: muy rojo, las colonias presentan un color rojo claro (Figura 1, a); rojo, las colonias presentan un color rojo oscuro (Figura 1, b); rojo oscuro, las colonias presentan un color rojo oscuro más cercano al negro (Figura 1, c); las colonias presentan un color rojo oscuro con bordes negros y un centro más oscuro que el resto (Figura 1, d); negro, las colonias eran de color negro y a veces con bordes rojizos (Figura 1, e); muy negro, las colonias son completamente oscuras (Figura 1, f).

#### 4.4 PRUEBAS GENOTÍPICAS

Se realizó reacciones de amplificación con PCR para detectar los genes *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*). Las reacciones de un total de 15 µl contenían 7,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA®), 0,6 µl de ADN, 0,6 µl de cebador forward, 0,6 de cebador reverse y 5,5 de agua grado molecular.

Para *Staphylococcus epidermidis* se utilizaron cebadores para los cuatro genes *ica*. Estos cebadores fueron tomados de la publicación de Paluch-Oleś et al., (2011) (Tabla 1) y se utilizaron las mismas condiciones, excepto por las temperaturas de templado de *icaA*, *icaB* e *icaC*. Estas temperaturas pasaron por un proceso de gradiente para obtener mejores resultados, siendo 52,3 °C, 57,6 °C y 40.6 °C respectivamente. Para *Staphylococcus aureus* se utilizaron los cebadores (*icaA* e *icaD*) descritos por Haddad et al., (2018) (Tabla 2) utilizando las mismas condiciones para la PCR.

Los amplicones resultantes de las PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1% mediante electroforesis, incluyendo un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt™ 100 pb ADN Ladder, Invitrogen). El proceso de tinción del gel se

realizó con fluorocromo SYBR™ Gold 10.000x (Invitrogen), disuelto a una concentración 2x (1µl de SYBR Gold en 5 ml de TBE) en solución tampón de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), Borato y Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) (44,5 mM tris-HCl, 44,5mM ácido bórico, 1,5 mM EDTA, 0,5 x TBE) y sumergiendo el gel en esta solución durante 1 hora en un lugar oscuro. Los resultados fueron fotografiados utilizando el fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

**Tabla 1. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes para la producción de biofilm en *Staphylococcus epidermidis***

Cebador	Secuencias del cebador	Longitud del producto	Condiciones de PCR	Referencia
<i>icaA</i> forward	5'-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3'	814 pb	30 s 95 °C	Paluch-Oleś et al., 2011
<i>icaA</i> reverse	5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3'		30 s 52,3°C	
<i>icaB</i> forward	5'-ATGGCTTAAAGCACACGACGC-3'	526 pb	1,5 min 72 °C	Paluch-Oleś et al., 2011
<i>icaB</i> reverse	5'-TATCGGCATCTGGTGTGACAG-3'		30 ciclos	
<i>icaC</i> forward	5'-ATAAACTTGAATTAGTGATT-3'	989 pb	1 min 95 °C	Paluch-Oleś et al., 2011
<i>icaC</i> reverse	5'-ATATATAAACTCTCTTAACA-3'		1 min 40.6 °C	
<i>icaD</i> forward	5'-AGGCAATATCCAACGGTAA-3'	371 pb	1,5 min 72 °C	Paluch-Oleś et al., 2011
<i>icaD</i> reverse	5'-GTCACGACCTTTCTTATATT-3'		30 ciclos	

(pb) Pares de base

**Tabla 2. Cebadores utilizados en la detección de genes codificantes para la producción de biofilm en *Staphylococcus aureus***

Cebador	Secuencias del cebador	Longitud del producto	Condiciones de PCR	Referencia
<i>icaA</i> forward	5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'	188 pb	30 s 94 °C	Haddad et al., 2018
<i>icaA</i> reverse	5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'		30 s 55 °C 45 s 72 °C 30 ciclos	
<i>icaD</i> forward	5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	198 pb	30 s 94 °C	Haddad et al., 2018
<i>icaD</i> reverse	5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3'		30 s 55 °C 45 s 72 °C 30 ciclos	

(pb) Pares de base

## 5. RESULTADOS

### 5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Durante el periodo establecido se colectaron 40 aislados del Hospital 1 (24 *S. epidermidis* y 16 *S. aureus*); en el Hospital 2 se colectaron 50 aislados (37 *S. epidermidis* y 13 *S. aureus*); y finalmente en el Hospital 3 se colectaron 9 aislados (solamente *S. aureus*) dando un total de 99 aislados clínicos. En el análisis se incluyó una la cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, resultando en un total de 100 muestras para las pruebas de fenotipo y genotipo, 61 *S. epidermidis* y 39 *S. aureus* (Tabla 3).

**Tabla 3. Lista de aislados colectados, hospital de origen y tipo de muestra, de los tres hospitales en orden de registro en la base de datos de la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA**

N° aislado	Código PUCE	Hospital	Origen de la Muestra	Identificación PUCE
1	CB-QCA 4524	Hospital 3	Secreción absceso	<i>S. aureus</i>
2	CB-QCA 4540	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
3	CB-QCA 4556	Hospital 3	Tejido óseo	<i>S. aureus</i>
4	CB-QCA 4566	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
5	CB-QCA 4569	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
6	CB-QCA 4571	Hospital 1	Herida abierta	<i>S. aureus</i>
7	CB-QCA 4574	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
8	CB-QCA 4576	Hospital 2	Líquido purulento	<i>S. aureus</i>
9	CB-QCA 4577	Hospital 1	Absceso	<i>S. aureus</i>
10	CB-QCA 4583	Hospital 2	C. pélvica Douglas	<i>S. aureus</i>
11	CB-QCA 4584	Hospital 2	Sangre	<i>S. aureus</i>
12	CB-QCA 4587	Hospital 2	Secreción vaginal	<i>S. aureus</i>
13	CB-QCA 4588	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
14	CB-QCA 4592	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
15	CB-QCA 4598	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
16	CB-QCA 4613	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
17	CB-QCA 4615	Hospital 1	Herida abierta	<i>S. aureus</i>

**Tabla 3. Lista de aislados colectados, hospital de origen y tipo de muestra, de los tres hospitales en orden de registro en la base de datos de la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA (Continuación...)**

<b>N° aislado</b>	<b>Código PUCE</b>	<b>Hospital</b>	<b>Origen de la Muestra</b>	<b>Identificación PUCE</b>
18	CB-QCA 4616	Hospital 1	Tejido	<i>S. epidermidis</i>
19	CB-QCA 4620	Hospital 1	Tejido	<i>S. epidermidis</i>
20	CB-QCA 4629	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
21	CB-QCA 4634	Hospital 2	Líquido cefalorraquídeo	<i>S. aureus</i>
22	CB-QCA 4636	Hospital 2	Nasofaríngeo	<i>S. epidermidis</i>
23	CB-QCA 4653	Hospital 2	Sin registro	<i>S. aureus</i>
24	CB-QCA 4655	Hospital 2	Sangre	<i>S. aureus</i>
25	CB-QCA 4656	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
26	CB-QCA 4659	Hospital 2	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
27	CB-QCA 4681	Hospital 2	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
28	CB-QCA 4682	Hospital 2	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
29	CB-QCA 4695	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
30	CB-QCA 4696	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
31	CB-QCA 4709	Hospital 2	Se. Traqueal	<i>S. epidermidis</i>
32	CB-QCA 4710	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
33	CB-QCA 4713	Hospital 1	Herida abierta	<i>S. epidermidis</i>
34	CB-QCA 4714	Hospital 1	Herida abierta	<i>S. aureus</i>
35	CB-QCA 4718	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
36	CB-QCA 4721	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
37	CB-QCA 4722	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
38	CB-QCA 4723	Hospital 1	Herida abierta	<i>S. aureus</i>
39	CB-QCA 4724	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
40	CB-QCA 4728	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
41	CB-QCA 4729	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
42	CB-QCA 4730	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
43	CB-QCA 4735	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
44	CB-QCA 4736	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
45	CB-QCA 4747	Hospital 1	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
46	CB-QCA 4749	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
47	CB-QCA 4750	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
48	CB-QCA 4784	Hospital 2	Sangre	<i>S. aureus</i>
49	CB-QCA 4798	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>

(CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica

**Tabla 3. Lista de aislados colectados, hospital de origen y tipo de muestra, de los tres hospitales en orden de registro en la base de datos de la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA (Continuación...)**

<b>N° aislado</b>	<b>Código PUCE</b>	<b>Hospital</b>	<b>Origen de la Muestra</b>	<b>Identificación PUCE</b>
50	CB-QCA 4799	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
51	CB-QCA 4814	Hospital 2	Sec. ocular	<i>S. epidermidis</i>
52	CB-QCA 4827	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
53	CB-QCA 4828	Hospital 2	Sangre	<i>S. aureus</i>
54	CB-QCA 4838	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
55	CB-QCA 4839	Hospital 2	Sangre	<i>S. aureus</i>
56	CB-QCA 4843	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
57	CB-QCA 4845	Hospital 1	Absceso	<i>S. aureus</i>
58	CB-QCA 4847	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
59	CB-QCA 4857	Hospital 2	Orina	<i>S. epidermidis</i>
60	CB-QCA 4858	Hospital 2	S. fosa nasal derecha	<i>S. epidermidis</i>
61	CB-QCA 4869	Hospital 2	S. herida quirúrgica	<i>S. epidermidis</i>
62	CB-QCA 4873	Hospital 1	Tejido	<i>S. aureus</i>
63	CB-QCA 4874	Hospital 1	Herida abierta	<i>S. aureus</i>
64	CB-QCA 4875	Hospital 1	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
65	CB-QCA 4881	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
66	CB-QCA 4888	Hospital 2	Líquido articular	<i>S. aureus</i>
67	CB-QCA 4889	Hospital 2	Absceso mamario	<i>S. aureus</i>
68	CB-QCA 4891	Hospital 2	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
69	CB-QCA 4892	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
70	CB-QCA 4899	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
71	CB-QCA 4901	Hospital 1	Orina	<i>S. epidermidis</i>
72	CB-QCA 4902	Hospital 1	Secreción ocular	<i>S. epidermidis</i>
73	CB-QCA 4909	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
74	CB-QCA 4911	Hospital 1	Tejido	<i>S. epidermidis</i>
75	CB-QCA 4926	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
76	CB-QCA 4927	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
77	CB-QCA 4929	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
78	CB-QCA 4930	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
79	CB-QCA 4931	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
80	CB-QCA 4943	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
81	CB-QCA 4944	Hospital 1	Orina	<i>S. aureus</i>

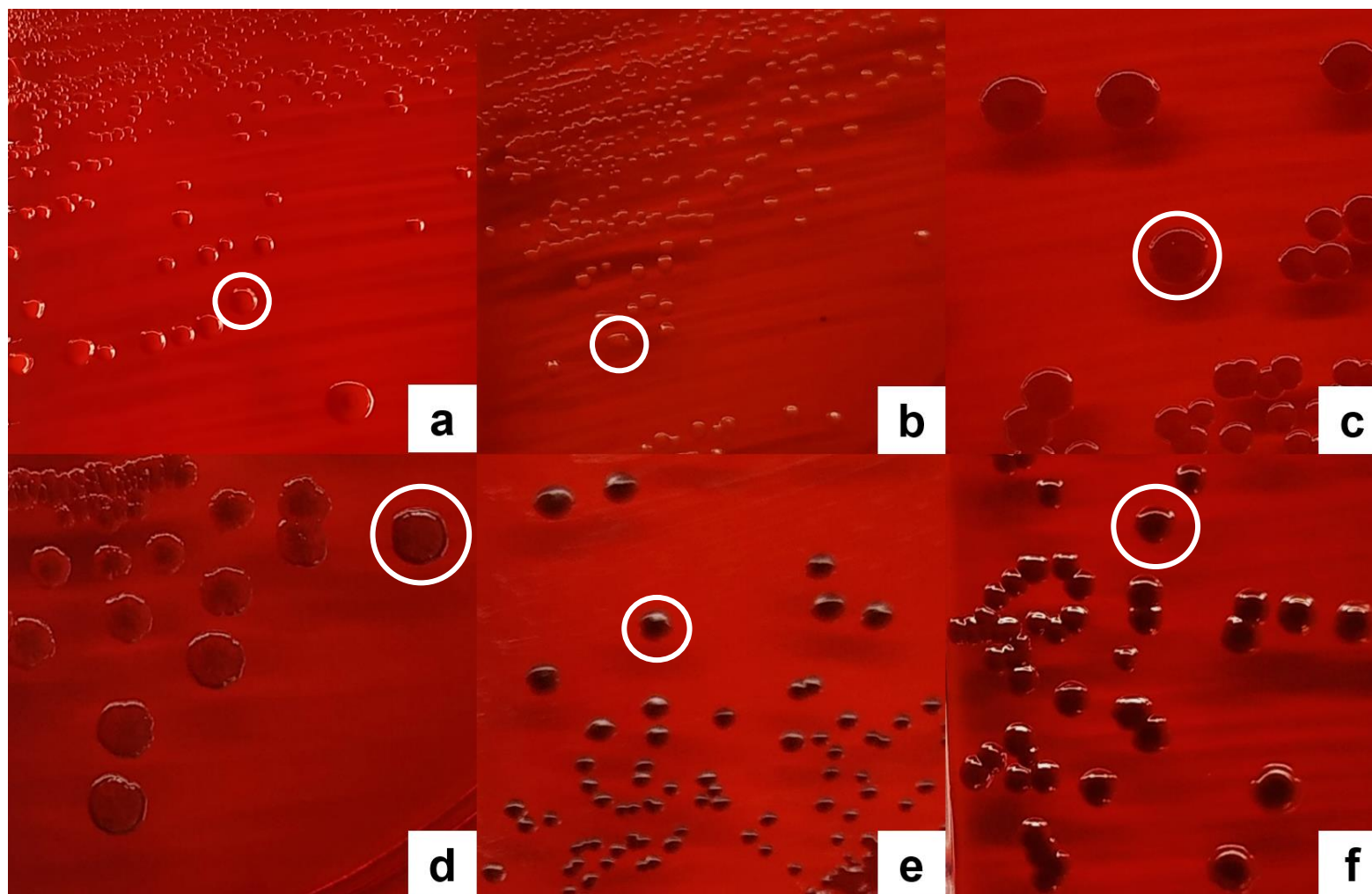
**Tabla 3. Lista de aislados colectados, hospital de origen y tipo de muestra, de los tres hospitales en orden de registro en la base de datos de la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA (Continuación...)**

N° aislado	Código PUCE	Hospital	Muestra	Identificación PUCE
82	CB-QCA 4947	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
83	CB-QCA 4949	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
84	CB-QCA 4951	Hospital 2	Orina	<i>S. epidermidis</i>
85	CB-QCA 4960	Hospital 3	Se. Punción abdominal	<i>S. aureus</i>
86	CB-QCA 4965	Hospital 3	S. traqueal	<i>S. aureus</i>
87	CB-QCA 4973	Hospital 3	Fisura	<i>S. aureus</i>
88	CB-QCA 4983	Hospital 2	Sin registro	<i>S. epidermidis</i>
89	CB-QCA 4986	Hospital 2	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
90	CB-QCA 4989	Hospital 2	Glándula de Bartolino	<i>S. aureus</i>
91	CB-QCA 4993	Hospital 1	Sangre	<i>S. aureus</i>
92	CB-QCA 4998	Hospital 1	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
93	CB-QCA 5001	Hospital 2	Punta catéter	<i>S. epidermidis</i>
94	CB-QCA 5002	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
95	CB-QCA 5003	Hospital 2	Sangre	<i>S. epidermidis</i>
96	CB-QCA 5018	Hospital 3	Sin registro	<i>S. aureus</i>
97	CB-QCA 5019	Hospital 3	Abscesos muslo derecho	<i>S. aureus</i>
98	CB-QCA 5020	Hospital 3	S. faríngea	<i>S. aureus</i>
99	CB-QCA 5021	Hospital 3	Canal medular	<i>S. aureus</i>
100	ATCC® 25923	-	-	<i>S. aureus</i>

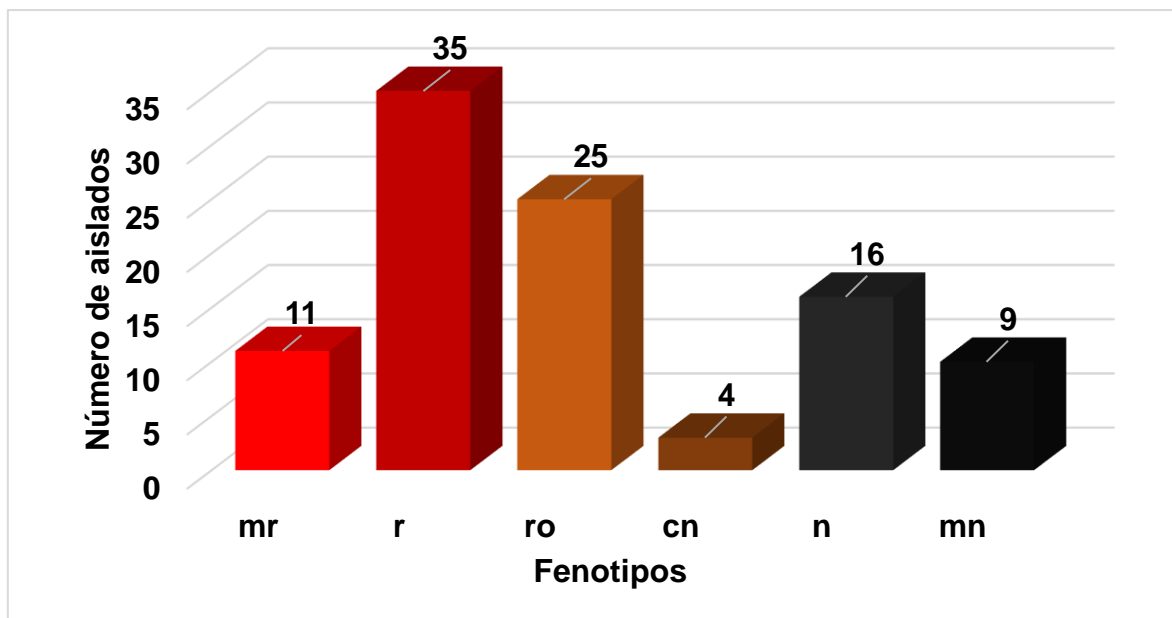
(CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica; (ATCC) Colección Americana de cultivos Tipo, en inglés American Type Culture Collection

## 5.2 PRUEBAS FENOTÍPICAS

Los fenotipos relacionados con la producción de biofilm son las variantes: casi negro, negro y muy negro; mientras que las variaciones muy rojo, rojo y rojo oscuro se relacionan con la ausencia de biofilm (Figura 1; Anexo 1). Los fenotipos más dominantes entre la población fueron rojo y rojo oscuro con 35/100 y 25/100 respectivamente, a continuación, el fenotipo negro con 16/100, muy negro 9/100, muy rojo 11/100 y casi negro 4/100 (Figura 2).



**Figura 1. Patrón colorimétrico reconocido en las muestras colectadas.** a) muy rojo, CB-QCA 4588 b) rojo, CB-QCA 4847 c) rojo oscuro, CB-QCA 4714 d) casi negro, CB-QCA 4620 e) negro, CB-QCA 4814 f) muy negro, CB-QCA 4659



**Figura 2. Número de fenotipos observados en las placas de agar rojo Congo en la población:** (mr) muy rojo; (r) rojo; (ro) rojo oscuro; (cn) casi negro; (n) negro; (mn) muy negro

El número de aislados con fenotipos positivos para la producción de biofilm: casi negro, negro, muy negro, por especie fueron muy bajos, siendo para *S. epidermidis* 21/61 (34,42%) aislados y de *S. aureus*, 8/39 (20,51%) aislados (Figura 3). Los 71 aislados restantes de *S. aureus* y *S. epidermidis* presentaron fenotipos negativos para la producción de biofilm: muy rojo, rojo, rojo oscuro (Tabla 4).

En el Hospital 1 14/40 (35%) aislados tuvieron fenotipos positivos, de los cuales 9 aislados fueron *S. epidermidis* y 5 *S. aureus*. En el Hospital 2 13/50 (26%) aislados fueron positivos, siendo 12 *S. epidermidis* y 1 *S. aureus*. En el Hospital 3 solamente 1/9 (11,11%) aislado mostró un fenotipo positivo (Figura 4). En total los aislados clínicos positivos fueron 28/99 (28,28%) y 29/100 con la ATCC® de *S. aureus* 25923.

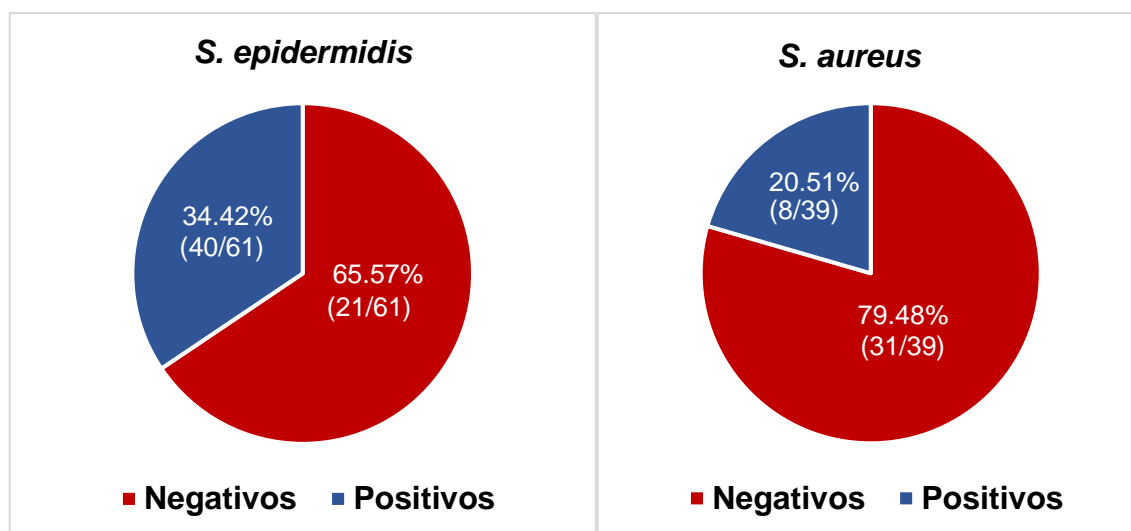


Figura 3. Porcentaje de fenotipos positivos a la prueba de producción de biofilm en agar rojo Congo por cada especie

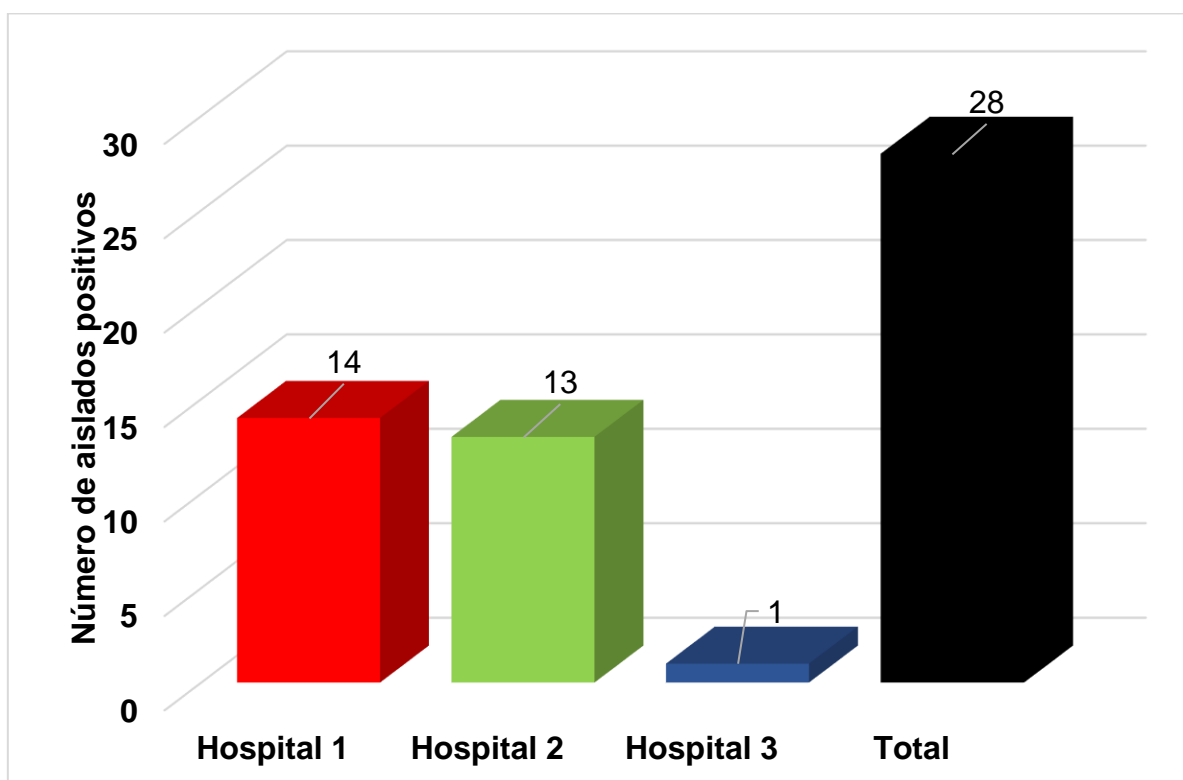
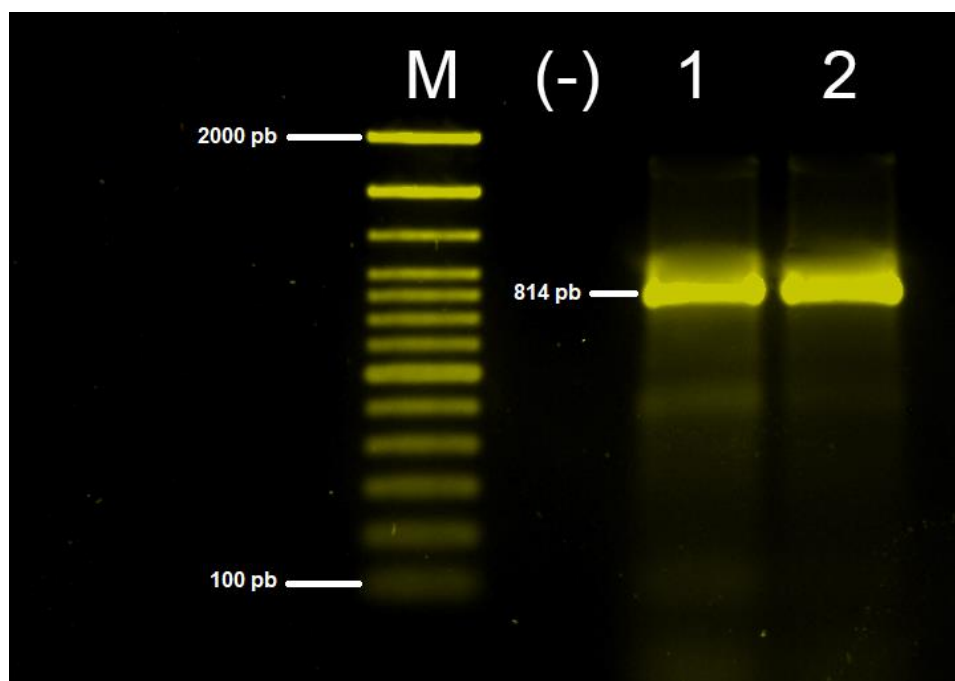


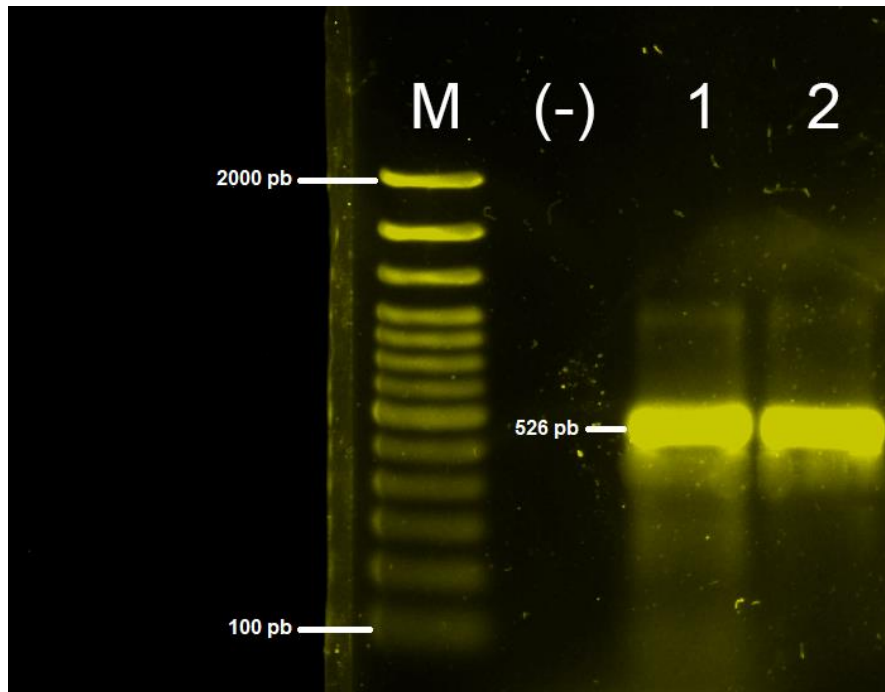
Figura 4. Número de aislados positivos a la prueba de formación de biofilm en medio agar rojo Congo por hospital de estudio

### 5.3 PRUEBAS GENOTÍPICAS

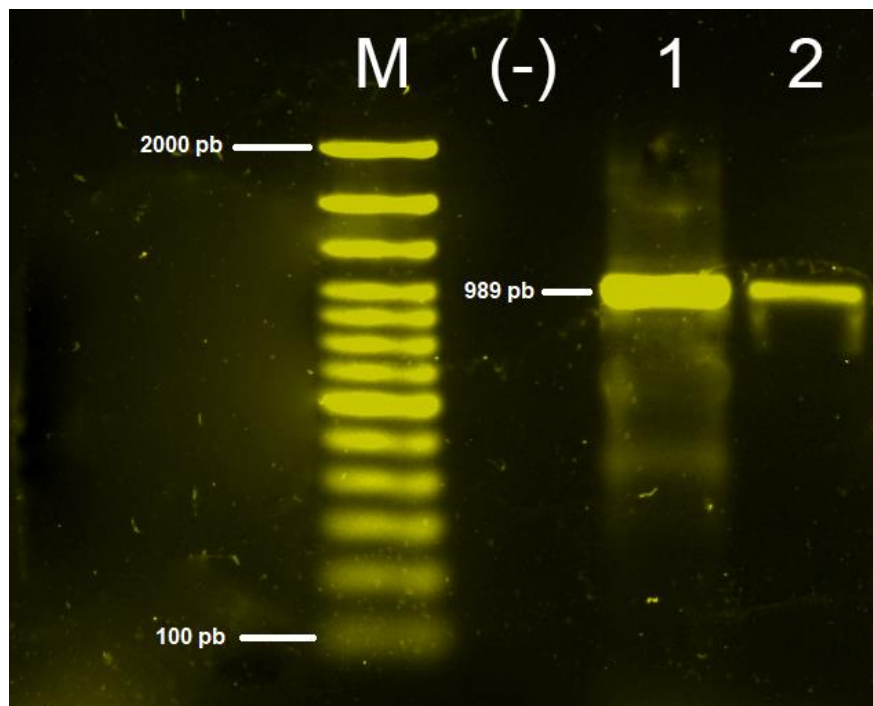
El resultado de las reacciones de amplificación para *S. epidermidis* mostró un porcentaje mayor al 50% de la población con presencia de los genes *icaA*, *icaB*, *icaD*; mientras que para *icaC* fue menor al 50%. El número de aislados positivos para *icaA* fue de 36/61 (59,02%) (Figura 5), 35/61 (57,38%) aislados para *icaB* (Figura 6), 26/61 (42,62%) para *icaC* (Figura 7) y 32/61 (52,46%) *icaD* (Figura 8). En *S. aureus* el porcentaje de aislados positivos para los genes *icaA* (Figura 9) e *icaD* (Figura 10) fue de 34/39 (87,18%) para ambos genes. En toda la población el total de genes positivos fue *icaA* 70/100, *icaB* 35/100, *icaC* 26/100 e *icaD* 66/100 (Tabla 4).



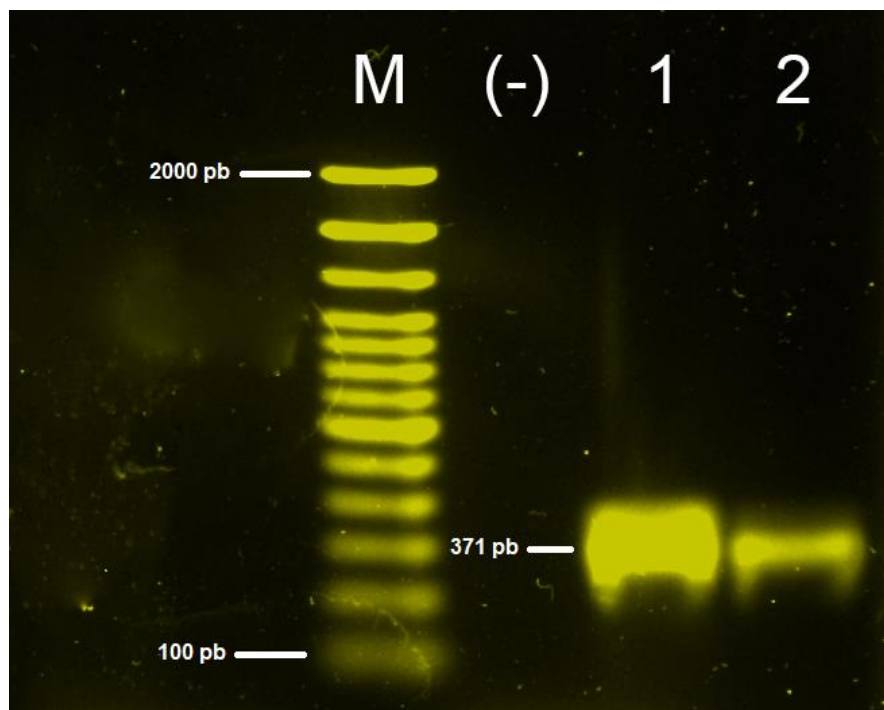
**Figura 5. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen *icaA* en *S. epidermidis*. M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4927**



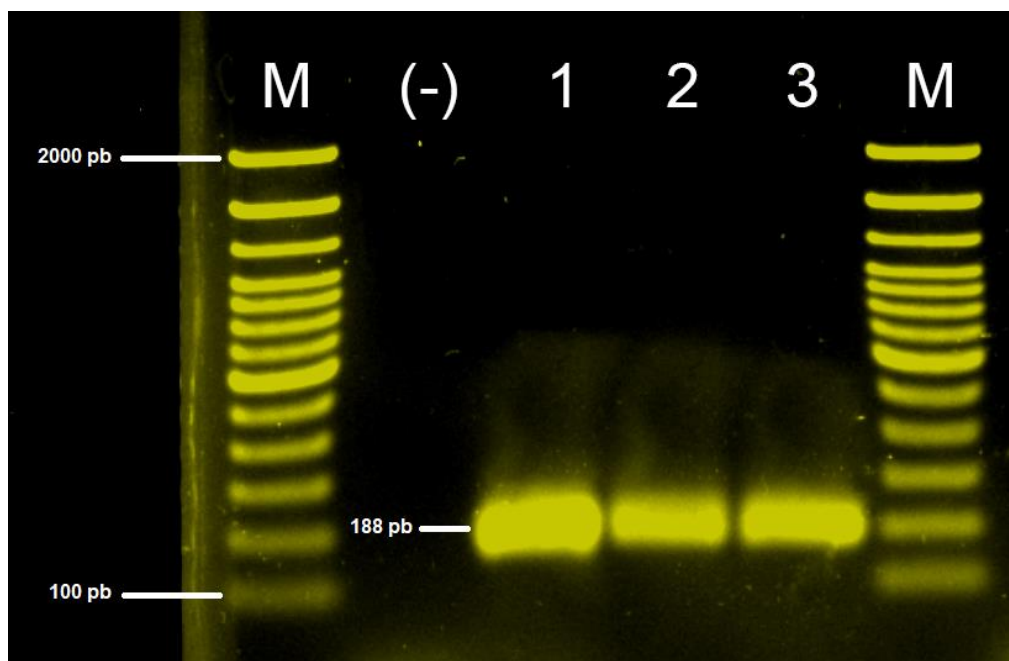
**Figura 6. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen *icaB* en *S. epidermidis*. M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4799**



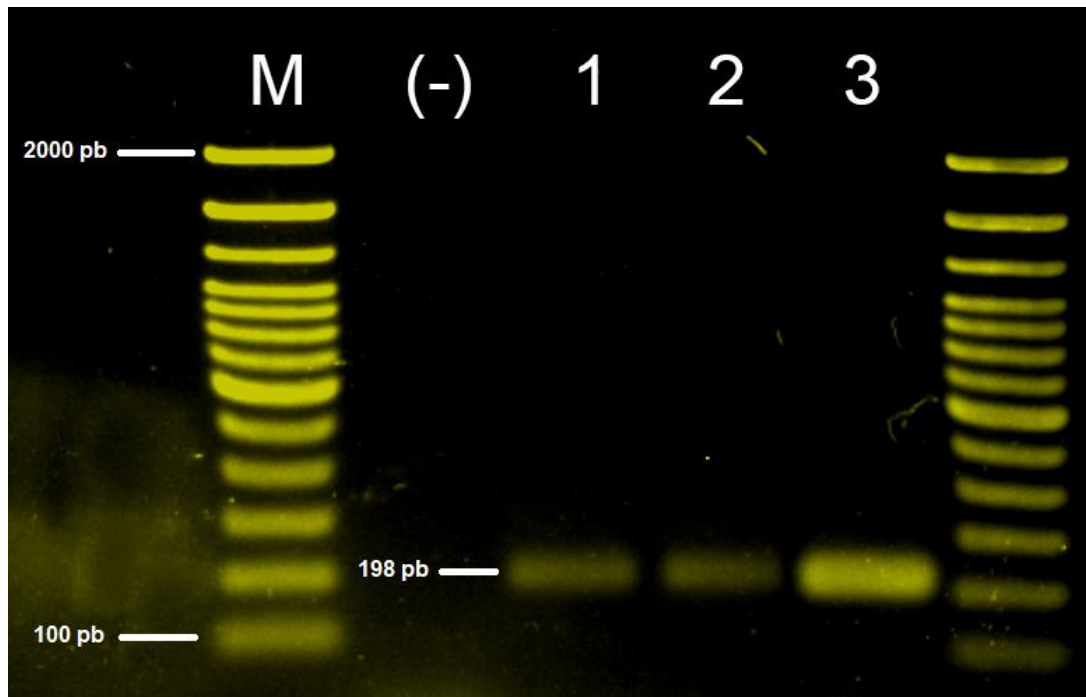
**Figura 7. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen *icaC* en *S. epidermidis*. M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4750**



**Figura 8. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen *icaD* en *S. epidermidis*.** M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4891; aislado 2, CB-QCA 4827



**Figura 9. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen *icaA* en *S. aureus*.** M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4584; aislado 2, CB-QCA 4751; aislado 3, CB-QCA 4583



**Figura 10. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos para el gen *icaD* en *S. aureus*.** M, marcador de peso molecular (100 pb); (-), control negativo; aislado 1, CB-QCA 4584; aislado 2, CB-QCA 4751; aislado 3, CB-QCA 4583

**Tabla 4. Resultados de presencia y ausencia de genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* y lecturas en placas de agar rojo Congo**

N° aislado	Código PUCE	Identificación	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	Rojo Congo
1	CB-QCA 4524	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	cn
2	CB-QCA 4540	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	n
3	CB-QCA 4556	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
4	CB-QCA 4566	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	ro
5	CB-QCA 4569	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
6	CB-QCA 4571	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	n
7	CB-QCA 4574	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
8	CB-QCA 4576	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mr
9	CB-QCA 4577	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
10	CB-QCA 4583	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
11	CB-QCA 4584	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
12	CB-QCA 4587	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
13	CB-QCA 4588	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	mr
14	CB-QCA 4592	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
15	CB-QCA 4598	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
16	CB-QCA 4613	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	cn
17	CB-QCA 4615	<i>S. aureus</i>	0	sc	sc	0	cn
18	CB-QCA 4616	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	0	n
19	CB-QCA 4620	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	cn
20	CB-QCA 4629	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
21	CB-QCA 4634	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mr
22	CB-QCA 4636	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	mn
23	CB-QCA 4653	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
24	CB-QCA 4655	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
25	CB-QCA 4656	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	mn
26	CB-QCA 4659	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	mn
27	CB-QCA 4681	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	0	mr
28	CB-QCA 4682	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	mr
29	CB-QCA 4695	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	mn
30	CB-QCA 4696	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	r
31	CB-QCA 4709	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	r
32	CB-QCA 4710	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	n

(1) presencia; (0) ausencia; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica; (cn) Casi negro, (mn) muy negro, (mr) muy rojo, (n) negro, (r) rojo, (ro) rojo oscuro; (sc) sin cebadores, *Staphylococcus aureus* no cuentan con cebadores para *ica B* y *C*.

**Tabla 4. Resultados de presencia y ausencia de genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* y lecturas en placas de agar rojo Congo (continuación...)**

N° aislado	Código PUCE	Identificación	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	Rojo Congo
33	CB-QCA 4713	<i>S. epidermidis</i>	1	0	0	1	n
34	CB-QCA 4714	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
35	CB-QCA 4718	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	mn
36	CB-QCA 4721	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
37	CB-QCA 4722	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mr
38	CB-QCA 4723	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
39	CB-QCA 4724	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
40	CB-QCA 4728	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
41	CB-QCA 4729	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	mr
42	CB-QCA 4730	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	ro
43	CB-QCA 4735	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
44	CB-QCA 4736	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	ro
45	CB-QCA 4747	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
46	CB-QCA 4749	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
47	CB-QCA 4750	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	n
48	CB-QCA 4784	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
49	CB-QCA 4798	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	n
50	CB-QCA 4799	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	ro
51	CB-QCA 4814	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	n
52	CB-QCA 4827	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
53	CB-QCA 4828	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
54	CB-QCA 4838	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	n
55	CB-QCA 4839	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	n
56	CB-QCA 4843	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	0	r
57	CB-QCA 4845	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
58	CB-QCA 4847	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	0	r
59	CB-QCA 4857	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	mn
60	CB-QCA 4858	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
61	CB-QCA 4869	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	ro
62	CB-QCA 4873	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	n
63	CB-QCA 4874	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mn
64	CB-QCA 4875	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
65	CB-QCA 4881	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r

(1) presencia; (0) ausencia; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica; (cn) Casi negro, (mn) muy negro, (mr) muy rojo, (n) negro, (r) rojo, (ro) rojo oscuro; (sc) sin cebadores, *Staphylococcus aureus* no cuentan con cebadores para *ica B* y *C*.

**Tabla 4. Resultados de presencia y ausencia de genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* y lecturas en placas de agar rojo Congo (continuación...)**

N° aislado	Código PUCE	Identificación	<i>ica A</i>	<i>ica B</i>	<i>ica C</i>	<i>ica D</i>	Rojo Congo
66	CB-QCA 4888	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mr
67	CB-QCA 4889	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
68	CB-QCA 4891	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	n
69	CB-QCA 4892	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	n
70	CB-QCA 4899	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	ro
71	CB-QCA 4901	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	mn
72	CB-QCA 4902	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
73	CB-QCA 4909	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	n
74	CB-QCA 4911	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
75	CB-QCA 4926	<i>S. aureus</i>	0	sc	sc	0	n
76	CB-QCA 4927	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	mn
77	CB-QCA 4929	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	r
78	CB-QCA 4930	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
79	CB-QCA 4931	<i>S. aureus</i>	0	sc	sc	0	ro
80	CB-QCA 4943	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	r
81	CB-QCA 4944	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	0	ro
82	CB-QCA 4947	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	r
83	CB-QCA 4949	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
84	CB-QCA 4951	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
85	CB-QCA 4960	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
86	CB-QCA 4965	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	r
87	CB-QCA 4973	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
88	CB-QCA 4983	<i>S. epidermidis</i>	1	1	0	1	ro
89	CB-QCA 4986	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
90	CB-QCA 4989	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mr
91	CB-QCA 4993	<i>S. aureus</i>	0	sc	sc	0	ro
92	CB-QCA 4998	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
93	CB-QCA 5001	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	mr
94	CB-QCA 5002	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	ro
95	CB-QCA 5003	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	r
96	CB-QCA 5018	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
97	CB-QCA 5019	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro

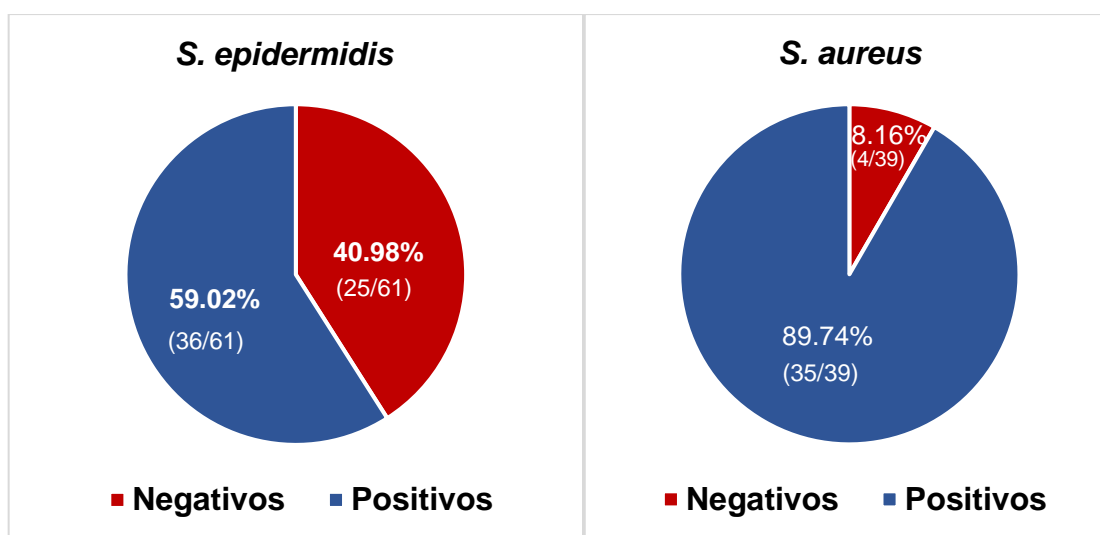
(1) presencia; (0) ausencia; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica; (cn) Casi negro, (mn) muy negro, (mr) muy rojo, (n) negro, (r) rojo, (ro) rojo oscuro; (sc) sin cebadores, *Staphylococcus aureus* no cuentan con cebadores para *ica B* y *C*.

**Tabla 4. Resultados de presencia y ausencia de genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* y lecturas en placas de agar rojo Congo (continuación)**

N° aislado	Código PUCE	Identificación	<i>ica A</i>	<i>ica B</i>	<i>ica C</i>	<i>ica D</i>	Rojo Congo
98	CB-QCA 5020	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	mr
99	CB-QCA 5021	<i>S. aureus</i>	1	sc	sc	1	ro
100	ATCC® 25923	<i>S. aureus</i>	0	sc	sc	1	n

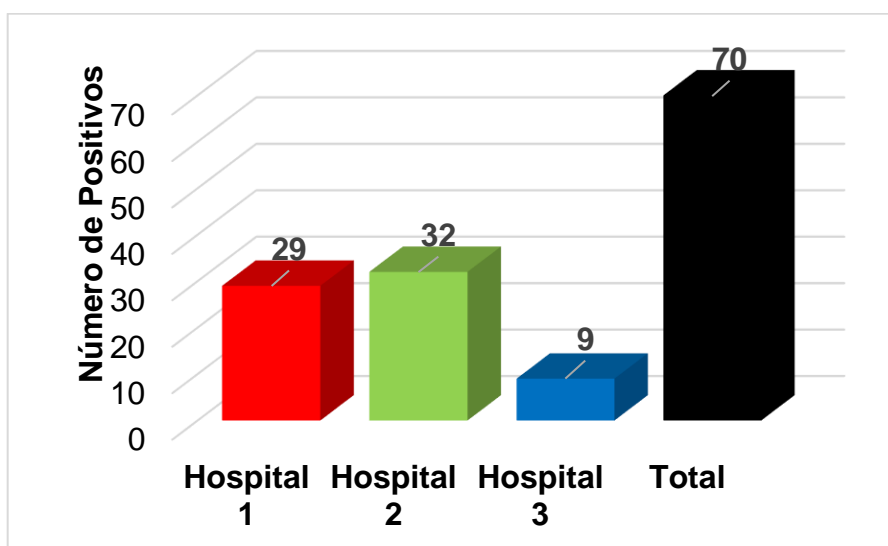
(1) presencia; (0) ausencia; (ATCC) Colección Americana de cultivos Tipo, en inglés American Type Culture Collection; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica; (cn) Casi negro, (mn) muy negro, (mr) muy rojo, (n) negro, (r) rojo, (ro) rojo oscuro; (sc) sin cebadores, *Staphylococcus aureus* no cuentan con cebadores para *ica B* y *C*.

El número de aislados positivos por especie es mayor en genotipo en relación con los fenotipos. En *S. epidermidis* se registraron 36/61 (59,02%) y en *S. aureus* 35/39 (89,74%) (Figura 11).



**Figura 11. Porcentaje de aislados positivos a la presencia de genes *ica* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por especie**

En el Hospital 1, 29/40 aislados fueron positivos a alguno de los 4 genes *ica*, siendo 17 aislados *S. epidermidis* y 12 aislados *S. aureus*. En el Hospital 2, 32/50 aislados fueron positivos a alguno de los cuatro genes, siendo 19 aislados *S. epidermidis* y 13 aislados *S. aureus*. En el Hospital 3, los 9 aislados de *S. aureus* fueron positivos a los genes *ica* (Figura 12). Incluyendo la cepa ATCC® fueron 71/100 aislados positivos dentro de la población.



**Figura 12. Número de aislados positivos a la presencia de genes *ica* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por hospitales**

#### **5.4 COMPARACIÓN DE LOS FENOTIPOS CON GENOTIPOS**

El número de aislados reconocidos como fenotípicamente positivos a la producción de biofilm con agar rojo Congo es menor a la cantidad de positivos obtenidos con las pruebas genotípicas. Fenotípicamente 29/100 (29,0%) presentan los fenotipos: casi negro, negro o muy negro, mientras que genotípicamente 71/100 (71,0%) tuvieron alguno de los 4 genes *ica* (Tabla 5). Sin embargo, 11 aislados que poseían un fenotipo positivo para la producción de biofilm en el agar rojo Congo, no obtuvieron resultados positivos a las amplificaciones de los genes codificantes para la producción de biofilm.

**Tabla 5. Comparación de presencia y ausencia de biofilm entre las pruebas fenotípicas en agar rojo Congo y las pruebas genotípicas con reacción de cadena de la polimerasa**

<b>N° aislado</b>	<b>Código PUCE</b>	<b>Biofilm por Rojo Congo</b>	<b>Biofilm por genotipo</b>
1	CB-QCA 4524	1	1
2	CB-QCA 4540	1	0
3	CB-QCA 4556	0	1
4	CB-QCA 4566	0	0
5	CB-QCA 4569	0	1
6	CB-QCA 4571	1	1
7	CB-QCA 4574	0	0
8	CB-QCA 4576	0	1
9	CB-QCA 4577	0	1
10	CB-QCA 4583	0	1
11	CB-QCA 4584	0	1
12	CB-QCA 4587	0	1
13	CB-QCA 4588	0	0
14	CB-QCA 4592	0	0
15	CB-QCA 4598	0	0
16	CB-QCA 4613	1	0
17	CB-QCA 4615	1	0
18	CB-QCA 4616	1	1
19	CB-QCA 4620	1	1
20	CB-QCA 4629	0	1
21	CB-QCA 4634	0	1
22	CB-QCA 4636	1	0
23	CB-QCA 4653	0	1
24	CB-QCA 4655	0	1
25	CB-QCA 4656	1	0
26	CB-QCA 4659	1	1
27	CB-QCA 4681	0	1
28	CB-QCA 4682	0	1
29	CB-QCA 4695	1	0
30	CB-QCA 4696	0	1
31	CB-QCA 4709	0	1
32	CB-QCA 4710	1	1

(1) presencia; (0) ausencia; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica

**Tabla 5. Comparación de presencia y ausencia de biofilm entre las pruebas fenotípicas en agar rojo Congo y las pruebas genotípicas con reacción de cadena de la polimerasa (continuación...)**

<b>N° aislado</b>	<b>Código PUCE</b>	<b>Biofilm por Rojo Congo</b>	<b>Biofilm por genotipo</b>
33	CB-QCA 4713	1	1
34	CB-QCA 4714	0	1
35	CB-QCA 4718	1	1
36	CB-QCA 4721	0	0
37	CB-QCA 4722	0	1
38	CB-QCA 4723	0	1
39	CB-QCA 4724	0	1
40	CB-QCA 4728	0	1
41	CB-QCA 4729	0	0
42	CB-QCA 4730	0	0
43	CB-QCA 4735	0	0
44	CB-QCA 4736	0	1
45	CB-QCA 4747	0	1
46	CB-QCA 4749	0	1
47	CB-QCA 4750	1	1
48	CB-QCA 4784	0	1
49	CB-QCA 4798	1	1
50	CB-QCA 4799	0	1
51	CB-QCA 4814	1	0
52	CB-QCA 4827	0	1
53	CB-QCA 4828	0	1
54	CB-QCA 4838	1	0
55	CB-QCA 4839	1	1
56	CB-QCA 4843	0	1
57	CB-QCA 4845	0	1
58	CB-QCA 4847	0	1
59	CB-QCA 4857	1	1
60	CB-QCA 4858	0	1
61	CB-QCA 4869	0	1
62	CB-QCA 4873	1	1
63	CB-QCA 4874	1	1
64	CB-QCA 4875	0	1

(1) Presencia; (0) ausencia; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica

**Tabla 5. Comparación de presencia y ausencia de biofilm entre las pruebas fenotípicas en agar rojo Congo y las pruebas genotípicas con reacción de cadena de la polimerasa (continuación...)**

<b>N° aislado</b>	<b>Código PUCE</b>	<b>Biofilm por Rojo Congo</b>	<b>Biofilm por genotipo</b>
65	CB-QCA 4881	0	1
66	CB-QCA 4888	0	1
67	CB-QCA 4889	0	1
68	CB-QCA 4891	1	1
69	CB-QCA 4892	1	0
70	CB-QCA 4899	0	1
71	CB-QCA 4901	1	0
72	CB-QCA 4902	0	0
73	CB-QCA 4909	1	1
74	CB-QCA 4911	0	1
75	CB-QCA 4926	1	0
76	CB-QCA 4927	1	1
77	CB-QCA 4929	0	1
78	CB-QCA 4930	0	1
79	CB-QCA 4931	0	0
80	CB-QCA 4943	0	1
81	CB-QCA 4944	0	1
82	CB-QCA 4947	0	1
83	CB-QCA 4949	0	0
84	CB-QCA 4951	0	0
85	CB-QCA 4960	0	1
86	CB-QCA 4965	0	1
87	CB-QCA 4973	0	1
88	CB-QCA 4983	0	1
89	CB-QCA 4986	0	0
90	CB-QCA 4989	0	1
91	CB-QCA 4993	0	0
92	CB-QCA 4998	0	0
93	CB-QCA 5001	0	1
94	CB-QCA 5002	0	0
95	CB-QCA 5003	0	0
96	CB-QCA 5018	0	1

(1) Presencia; (0) ausencia; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica

**Tabla 5. Comparación de presencia y ausencia de biofilm entre las pruebas fenotípicas en agar rojo Congo y las pruebas genotípicas con reacción de cadena de la polimerasa (continuación)**

<b>N° aislado</b>	<b>Código PUCE</b>	<b>Biofilm por Rojo Congo</b>	<b>Biofilm por genotipo</b>
<b>97</b>	CB-QCA 5019	0	1
<b>98</b>	CB-QCA 5020	0	1
<b>99</b>	CB-QCA 5021	0	1
<b>100</b>	ATCC® 25923	1	1
<b>Total</b>		<b>29</b>	<b>71</b>

(1) Presencia; (0) ausencia; (ATCC) Colección Americana de cultivos Tipo, en inglés American Type Culture Collection; (CB-QCA) Colección Bacteriana Quito Católica

## 6. DISCUSIÓN

En la actualidad, se deben tomar en cuenta distintos factores al momento de tratar una infección bacteriana, ya que cada especie puede mostrar diferentes formas de combatir los agentes antimicrobianos. Los mecanismos primarios son las resistencias innatas, ya sean por: desactivación enzimática del agente, acumulación reducida del agente por afluencia reducida o eflujo incrementado, o distintos tipos de modificaciones del sitio blanco (Duijkeren, Schink, Roberts, Wang y Schwarz, 2018).

A continuación, el factor de creciente preocupación es la resistencia adquirida a distintos agentes antimicrobianos. Existe una urgente búsqueda por nuevos antibióticos para luchar contra bacterias multirresistentes, ya que están en constante evolución debido a la presión selectiva que reciben y el uso indiscriminado de antibióticos (Tacconelli et al., 2018). Esto se debe a la facilidad que tienen las bacterias de compartir material genético mediante la conjugación, transducción y transformación (Haaber et al., 2017).

Por último, pero no menos importante, se encuentran distintos factores de virulencia que poseen las distintas especies de bacterias. Tanto en *S. epidermidis* como en *S. aureus* podemos encontrar un factor de virulencia en común, el biofilm. Este ha sido uno de los factores de virulencia que ha convertido a *S. epidermidis* en una creciente preocupación como patógeno oportunista en ambientes de hospital. Este le permite adherirse a varias superficies de aparatos médicos y evitar el sistema inmune del hospedero (Otto, 2009; Arciola, Campoccia, y Montanaro, 2018). *S. aureus*, además de tener un arsenal de factores de virulencia, también posee los mismos genes para la producción de biofilm, con una similitud de *icaA* e *icaD* de 76 y 72% respectivamente (Rohde, Knobloch, Horstkotte y Mack, 2001).

En la presente investigación las pruebas de rojo Congo mostraron una variabilidad en los fenotipos presentes en la población. De estos, los dominantes fueron los fenotipos rojo y rojo oscuro, y en menor cantidad los fenotipos negros relacionados con la producción de biofilm. Considerando a los fenotipos casi negro, negro y muy negro como biofilm positivos, se identificó que el 34,43 % de los

aislados de *S. epidermidis* y el 20,51% de los aislados de *S. aureus* fueron positivos a la presencia de biofilm. Esto contrasta con los resultados obtenidos por los análisis genotípicos, donde existieron un mayor número de aislados positivos a la presencia de genes codificantes para la producción de biofilm. Esto se puede deber al requerimiento de estrés ambiental o condiciones óptimas para que la bacteria sea capaz de producir biofilm. Por ejemplo: la presencia de etanol, isopropanol, NaCl y un pH cercano a 7 (O’Gara, 2007; Luther, Bilida, Mermel y LaPlante, 2015; Tango et al., 2018).

Las bacterias empleadas en esta investigación fueron sometidas a un tipo de estrés ambiental al ser cultivadas en agar manitol salado previamente a la inoculación en agar rojo Congo. Pero la expresión también depende de varios factores que están constantemente regulando la producción de biofilm. El gen *icaR* codifica un represor del gen *icaA*, que se adhiere a la región promotora del locus *ica* (Anexo 2) (Conlon, Humphreys y O’Gara, 2002; O’Gara, 2007). Otro regulador es el elemento móvil IS256, que puede acoplarse en distintas regiones del locus *ica*, provocando que una cepa positiva a la producción de biofilm se vuelva negativa (Ziebuhr et al. 1999; Arciola et al., 2015; Arciola, Campoccia, y Montanaro, 2018).

Por esta razón es necesario complementar los estudios fenotípicos con el análisis molecular de los genes asociados a la producción de biofilm. Con las reacciones de PCR se incrementó el número inicial de aislados positivos a la producción de biofilm de 29/100 a 71/100. Aunque el método de agar rojo Congo es utilizado generalmente para confirmar la presencia de biofilm, no siempre se puede determinar exactamente si el aislado es positivo a la presencia de genes *ica* productores de biofilm (Lee, Bae, Han y Lee, 2016). Por esto se han propuesto modificaciones al método del agar rojo Congo para volverlo más efectivo en la detección de biofilm incrementando el estrés a la bacteria. Existen una variedad de propuestas como cambiar el agar de Infusión cerebro corazón (BHI agar) por caldo Tripticasa soya (TSB) (Lee, Bae, Han y Lee, 2016), o añadir NaCl (Kaiser et al., 2013).

El porcentaje de aislados positivos después de las pruebas genotípicas se incrementó de 34,43% al 59,02% en *S. epidermidis* y de 20,51% al 89,74% en *S.*

*aureus*. En la literatura se pueden observar patrones similares, en el que hay un mayor porcentaje de aislados positivos para genes *ica* en *S. aureus* que en *S. epidermidis*. En Calà et al. (2015), de una población de *S. epidermidis* proveniente de la piel de pacientes hospitalizados los resultados positivos fueron de 45/105 aislados (42,85%). Solati, Tajbakhsh, Khamesipour y Gugnani (2015) obtuvieron 35/80 aislados de *S. epidermidis* productores de biofilm provenientes de distintas muestras (orina 52,5%, sangre 28,75% y bolsas de diálisis 18,75%). De estos, existió una variación de presencia de genes relacionados con la cantidad de biofilm producido. Esto explica la variación de genes presentes en aislados de *S. epidermidis* de la presente investigación que carecía de todos los genes, donde solo 35/61 aislados (57,38%) fueron positivos para *icaB* y 26/61 (42,62) fueron positivos para *icaC*.

El porcentaje de aislados de *S. aureus* positivos a la amplificación del gen *icaA* en la presente investigación fue de 34/39 aislados (87,18%) y para *icaD* 34/39 aislados (87,18%). Existe una variedad de resultados sobre la presencia de los genes *ica* en *S. aureus*. En Mirzaee, Peerayeh y Ghasemian (2014) se estudiaron 63 aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y encontraron una prevalencia de 38/63 aislados (60,3%) con presencia del gen *icaA* y 63/63 aislados (100%) con presencia del gen *icaD*. En Knobloch, Horstkotte, Rohde y Mack (2002) entre 82 aislados de cultivos de sangre y 26 nasales de *S. aureus*, la totalidad poseía los genes *ica*. Esto puede se explica en Rhode, Knobloch, Horstkotte, y Mack (2001) como una variación dependiente del origen de las muestras. Esto se podía notar en Arciola, Baldassarri y Montanaro (2001), donde solo el 61% de su población de *S. aureus* provenientes de infecciones por catéteres poseían los genes *icaA* e *ica D*. Pero en otro estudio de (Arciola et al., 2005) con muestras obtenidas de prótesis ortopédicas, el porcentaje de positivos aumentó significativamente.

En esta investigación los aislados provienen de distintos tipos de muestras y los porcentajes de resultados positivos varían, tanto por especie como por muestra: muestras de sangre 27/44 (61,36%) (18 *S. epidermidis* y 9 *S. aureus*), muestras provenientes de punta de catéter 7/7 (100%) todas *S. epidermidis*, muestras de orina 2/2 (100%) *S. aureus* y *S. epidermidis*, muestras de abscesos 4/4 (100%)

todas *S. aureus*; por lo que relacionar el porcentaje de positivos con el origen de la muestra no es posible.

Hubieron 11 aislados que poseían un fenotipo positivo para la producción de biofilm en agar rojo Congo sin dar resultados positivos en las reacciones de amplificación. Esto pudo haber ocurrido por dificultades en la digestión de la pared celular, ya que el protocolo de PROMEGA® recomienda usar una mezcla de 60 µl de Lisozima (10 mg/ml) y 60 µl de Lisostafina (10 mg/ml) para una buena lisis de la pared celular. En esta investigación se utilizó 120 µl de Lisozima (10 mg/ml). Otra posibilidad pudo haber sido la fuerte presencia de biofilm en las colonias, esto pudo haber dificultado actividad enzimática de la Lisozima, de una manera similar en la que evade el contacto con los leucocitos en un cuerpo huésped (Arciola, Campoccia y Montanaro, 2018).

La presente investigación ha logrado comprobar que los genes *ica* están presentes en las poblaciones de *S. aureus* y *S. epidermidis* provenientes de hospitales de dos ciudades. En Kozitskaya et al. (2004) relacionan la presencia de los genes *icaADBC* con resistencias a antibióticos y a la presencia de múltiples copias del elemento móvil IS256 en cepas clínicas, sugiriendo que este conjunto de elementos proporciona una variabilidad que le brinda una ventaja frente a cambios ambientales.

El estudio de biofilm en estafilococos dentro de Latinoamérica se concentra en Brasil. Sobre *S. epidermidis*, Silva (2014) encontró una incidencia del 48% de cepas de hospital que presentaban los genes *ica*. En cuanto a *S. aureus*, Batistao et al. (2016) encontraron que las cepas de su estudio cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec, por sus siglas en inglés) tipo III, que le confiere la resistencia a la meticilina.

Dentro de Ecuador no existen estudios de biofilm en *S. aureus* y *S. epidermidis*. Pero existen estudios sobre los grupos clonales de *S. aureus* circulantes en el país con los cuales podemos relacionar la presencia de biofilm. Según Zurita, Barba, Ortega-Paredes, Mora y Rivadeneira (2016) los clones de *S. aureus* USA300-LV y USA600 fueron encontrados en el país. Estos poseen una

diversidad de cepas capaces de producir biofilm fuertes o débiles (King, Kulhankova, Stach, Vu y Salgado-Pabón, 2016).

Conociendo que los grupos clonales de *S. aureus* capaces de producir biofilm se encuentran presentes en el país, se podría esperar que existan varias resistencias a antibióticos transferidas entre *S. aureus* y *S. epidermidis*. Esto debido a que ambas bacterias suelen compartir nichos y el biofilm es un ambiente propicio que mejora la capacidad de transferencia horizontal de material genético (Savage, Chopra y O'Neill, 2013; Haaber et al., 2017). La transferencia de resistencias a aminoglucósidos y a Linezolid entre *S. aureus* y *S. epidermidis* ha sido documentada en varios estudios (Haaber et al., 2017; Cafini et al. 2016), por lo que el crecimiento de *S. epidermidis* como un patógeno casual en hospitales es de esperarse.

Comprender el funcionamiento del locus *ica* nos puede brindar pistas sobre los tratamientos médicos a seguir en caso de infecciones con bacterias productoras de biofilm, para lo que se suele recomendar remoción quirúrgica del implante infectado y administración de vancomicina en caso de ser resistente a la meticilina (MRSA) (Archer et al., 2011). McCarthy et al., (2015) al relacionar la producción de biofilm en aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y sensibles a la meticilina (MSSA), notaron que los aislados sensibles producían biofilm *ica*-dependiente, mientras que los resistentes formaban biofilm *ica*-independientes, indicando que cuando las bacterias adquieren la resistencia prefieren producir biofilm del tipo proteico (*ica*-independiente) al biofilm tipo polisacárido (*ica*-dependiente).

El estudio del biofilm de tipo PIA es un área que aún requiere de mucha investigación. Todavía se desconoce si los genes pueden ser transferidos horizontalmente (Kozitskaya et al., 2005) o de tratamientos efectivos. Para futuros proyectos se podría evaluar la relación de la producción de biofilm con resistencias a otro tipo de antibióticos como en Kozitskaya et al. (2004) dentro del país, ya que conocemos que existen cepas capaces de producir biofilm con resistencias a algunos antibióticos (Batistao et al., 2016). Existen estrategias terapéuticas que se encuentran en fase pre-clínica como péptidos antimicrobianos, bacteriófagos,

enzimas degradantes de biofilm o bloqueadores de quorum sensing, pero aún no logran su cometido al 100% (Otto, 2019) por lo que la investigación debe continuar para prevenir las complicaciones en el tratamiento de infecciones de hospital con *S. aureus* o con *S. epidermidis*.

## 7. CONCLUSIONES

1. Dentro de las ciudades de Quito y el Puyo existe concurrencia de infecciones con *S. aureus* y *S. epidermidis* con capacidad de producir biofilm.
2. Las pruebas fenotípicas con el método de agar rojo Congo no son 100% exactas en la identificación de aislados capaces de producir biofilm *ica*-dependiente.
3. La expresión de biofilm es muy variada, como se pudo evidenciar en los distintos fenotipos mostrados en rojo Congo.
4. La verificación por medio de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es la mejor manera de verificar la presencia de genes productores de biofilm *ica*-dependiente.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. y Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus biofilms*: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459.
- Arciola, C. R., Baldassarri, L. y Montanaro, L. (2001). Presence of icaA and icaD Genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6), 2151-2156.
- Arciola, C. R., Campoccia, D. y Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 397.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E. y Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*, 23(21), 4233-4239.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S. y Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5(7), 1-10.
- Arciola, C. R., Gamberini, S., Campoccia, D., Visai, L., Speziale, P., Baldassarri, L. y Montanaro, L. (2005). A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in Staphylococcus epidermidis. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 75(2), 408-413.
- Batistao, D., Amaral de Campos, P., Camilo, N. C., Royer, S., Araújo, B. F., Naves, K. S. C., Martins, M., Pereira, M. O., Henriques, M., Gontijo-Filho, P.P., Botelho, C. M., Oliveira, R. y Ribas, R. (2016). Biofilm formation of Brazilian meticillin-resistant Staphylococcus aureus strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. *Journal of Medical Microbiology*, 65(4), 286-297.
- Cafini, F., Nguyen, L. T. T., Higashide, M., Román, F., Prieto, J. y Morikawa, K. (2016). Horizontal gene transmission of the cfr gene to MRSA and

- Enterococcus: role of *Staphylococcus epidermidis* as a reservoir and alternative pathway for the spread of linezolid resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 587-592.
- Calà, C., Amodio, E., Di Carlo, E., Virruso, R., Fasciana, T. y Giammanco, A. (2015). Biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from the skin of hospitalized patients: genetic and phenotypic characteristics. *New Microbiol*, 38(4), 521-9.
- Carr, A. L., Daley, M. J., Givens Merkel, K. y Rose, D. T. (2018). Clinical Utility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Screening for Antimicrobial Stewardship: A Review of Current Literature. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 38(12), 1216-1228.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. y O'Gara, J. P. (2002). *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*, 184(16), 4400-4408.
- David, M. y Daum, R. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. In *Staphylococcus aureus* (pp. 325-383). Springer, Cham.
- Dong, Y., Speer, C. P. y Glaser, K. (2018). Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*, 9(1), 621-633.
- Van Duijkeren, E., Schink, A. K., Roberts, M. C., Wang, Y. y Schwarz, S. (2018). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 51-82.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R. y Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874
- Granslo, H. N. (2012). *Staphylococcus epidermidis*-virulence factors and innate immune response. Recuperado de: <https://munin.uit.no/handle/10037/5051>. Fecha: 28/05/2019
- Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Isturiz, R., Alvarez, C., Bavestrello, L., Gotuzzo, E., Labarca, J., Luna, C., Rodríguez-Noriega, E., Salles, M., Zurita, J. y Seas, C. (2009). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *International journal of antimicrobial agents*, 34(4), 304-308.

- Haaber, J., Penadés, J. R. y Ingmer, H. (2017). Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 25(11), 893-905.
- Haddad, O., Merghni, A., Elargoubi, A., Rhim, H., Kadri, Y. y Mastouri, M. (2018). Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *BioMed Central Infectious Diseases*, 18(1), 560.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W. y Becker, K. (2019). Are coagulase-negative staphylococci virulent?. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(9), 1071-1080.
- Hennig, S. y Ziebuhr, W. (2008). A transposase-independent mechanism gives rise to precise excision of IS256 from insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1488-1490.
- Jaśkiewicz, M., Janczura, A., Nowicka, J. y Kamysz, W. (2019). Methods Used for the Eradication of Staphylococcal Biofilms. *Antibiotics*, 8(4), 174.
- Ji, Y. (2007). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols* (Vol. 1). New Jersey: Humana Press.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P. y Nunes, A. P. F. (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(3), 235-239.
- King, J. M., Kulhankova, K., Stach, C. S., Vu, B. G. y Salgado-Pabón, W. (2016). Phenotypes and virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 clonal lineages. *mSphere*, 1(3).
- Kleinschmidt, S., Huygens, F., Faoagali, J., Rathnayake, I. U. y Hafner, L. M. (2015). *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiology*, 10(11), 1859-1879
- Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A., Rohde, H. y Mack, D. (2002). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology*, 191(2), 101-106.
- Knobloch, K. M., Von Osten, H., Horstkotte, M. A., Rohde, H. y Mack, D. (2008). Biofilm formation is not necessary for development of quinolone-resistant “persister” cells in an attached *Staphylococcus epidermidis* population. *The International Journal of Artificial Organs*, 31(9), 752-760.
- Koneman, E. y Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico: Texto y Atlas en Color*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

- Kourtis, A. P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E. y Ray, S. M. (2019). Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections—United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(9), 214.
- Kozitskaya, S., Cho, S. H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K. y Ziebuhr, W. (2004). The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection and immunity*, 72(2), 1210-1215.
- Kozitskaya, S., Olson, M. E., Fey, P. D., Witte, W., Ohlsen, K. y Ziebuhr, W. (2005). Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, 43(9), 4751-4757.
- Laboratorios Britania. Hoja técnica: Manitol Salado Agar. Recuperado de: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5e42a03c9f65c.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5e42a03c9f65c.pdf)
- Lee, J. S., Bae, Y. M., Han, A. y Lee, S. Y. (2016). Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 73, 707-714.
- Lim, S., Lee, D. H., Kwak, W., Shin, H., Ku, H. J., Lee, J. E., Lee, G. E., Kim, H., Choi, S. H., Ryu, S. y Lee, J. H. (2015). Comparative genomic analysis of *Staphylococcus aureus* FORC\_001 and *S. aureus* MRSA252 reveals the characteristics of antibiotic resistance and virulence factors for human infection. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 98-108.
- Luther, M. K., Bilida, S., Mermel, L. A. y LaPlante, K. L. (2015). Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infectious diseases and therapy*, 4(2), 219-226.
- McCarthy, H., Rudkin, J. K., Black, N. S., Gallagher, L., O'Neill, E. y O'Gara, J. P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5(1), 1-9.
- Mirzaee, M., Najar Peerayeh, S. y Ghasemian, A. M. (2014). Detection of *icaABCD* genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pathology*, 9(4), 257-262.

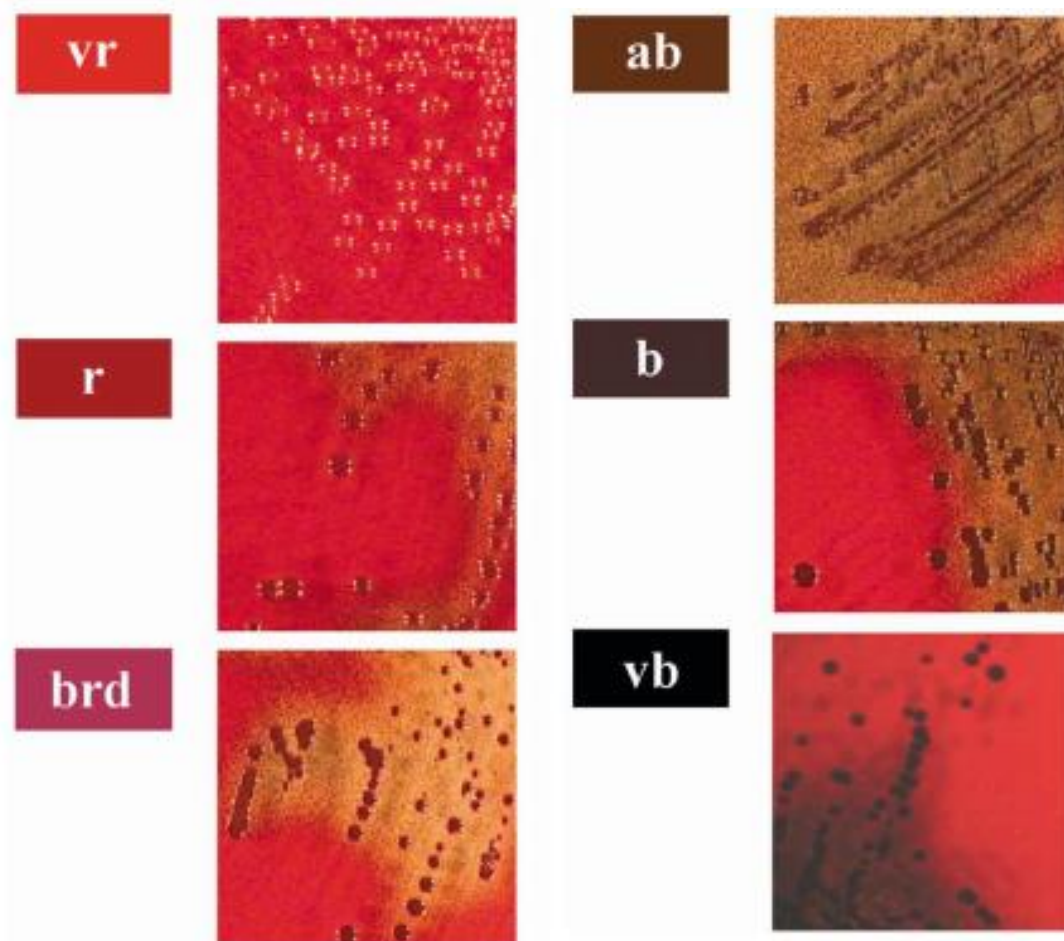
- O'Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 270(2), 179-188.
- Oliveira, W. F., Silva, P. M. S., Silva, R. C. S., Silva, G. M. M., Machado, G., Coelho, L. C. B. B. y Correia, M. T. S. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *Journal of Hospital Infection*, 98(2), 111-117.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Comunicado de prensa]. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555.
- Otto, M. (2019). Staphylococcal biofilms. *Gram-Positive Pathogens*, 699-711.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona, España, Marge Books.
- Paluch-Oleś, J., Magryś, A., Koziol-Montewka, M., Niedzielski, A., Niedźwiadek, J., Niedzielska, G. y Kotowski, M. (2011). The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 75(1), 126-130.
- Panlilio, A., Culver, D., Gaynes, R., Banerjee, S., Henderson, T., Tolson, J., Martone, W. y National Nosocomial Infections Surveillance System. (1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975–1991. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 13(10), 582-586.
- Petrelli, D., Zampaloni, C., d'Ercole, S., Prena, M., Ballarini, P., Ripa, S. y Vitali, L. A. (2006). Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(12), 773-781
- Roch, M., Gagetti, P., Davis, J., Ceriana, P., Errecalde, L., Corso, A. y Rosato, A. E. (2017). Daptomycin resistance in clinical MRSA strains is associated with a high biological fitness cost. *Frontiers in microbiology*, 8, 2303.

- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F. y García, J. (2006). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rohde, H., Knobloch, J. K., Horstkotte, M. A. y Mack, D. (2001). Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBCgenotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4595-4596.
- Ruano, C. I., Maldonado, J. C. y Salazar, R. (2004). Frecuencia de infección nosocomial en terapia intensiva: datos del proyecto PIN-FCM. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 42(1), 0-0
- Savage, V. J., Chopra, I. y O'Neill, A. J. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(4), 1968-1970.
- Silva Filho, R. G. D. (2014). *Produção de biofilme em amostras clínicas de S. epidermidis*: influência de concentrações subinibitórias de antissépticos (etanol e clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência (Doctoral dissertation). Recuperado de: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10997>
- Solati, S. M., Tajbakhsh, E., Khamesipour, F. y Gugnani, H. C. (2015). Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *Applied Microbiology Express*, 5(1), 47.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L. y Ouellette, M. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.
- Tango, C. N., Akkermans, S., Hussain, M. S., Khan, I., Van Impe, J., Jin, Y. G. y Oh, D. H. (2018). Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food microbiology*, 76, 287-295.
- Traisaeng, S., Herr, D. R., Kao, H. J., Chuang, T. H. y Huang, C. M. (2019). A derivative of butyric acid, the fermentation metabolite of *Staphylococcus epidermidis*, inhibits the growth of a *Staphylococcus aureus* strain isolated from atopic dermatitis patients. *Toxins*, 11(6), 311.
- Vogel, M., Schmitz, R. P., Hagel, S., Pletz, M. W., Gagelmann, N., Scherag, A. y Brunkhorst, F. M. (2016). Infectious disease consultation for *Staphylococcus*

- aureus bacteremia—A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 72(1), 19-28.
- Wei, H., Mao, F., Ni, S., Chen, F., Li, B., Qiu, X., Hu, L., Wang, M., Zheng, X., Zhu, J. y Lan, L. (2018). Discovery of novel piperonyl derivatives as diapophytoene desaturase inhibitors for the treatment of methicillin-, vancomycin-and linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *European journal of medicinal chemistry*, 145, 235-251.
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T. y Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6): e1403
- Zapotoczna, M., O'Neill, E. y O'Gara, J. P. (2016). Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS pathogens*, 12(7), e1005671.
- Zecconi, A. y Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology letters*, 150(1-2), 12-22
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lößner, I., Götz, F. y Hacker, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology*, 32(2), 345-356.
- Zurita, J., Barba, P., Ortega-Paredes, D., Mora, M. y Rivadeneira, S. (2016). Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(6), 525-533.

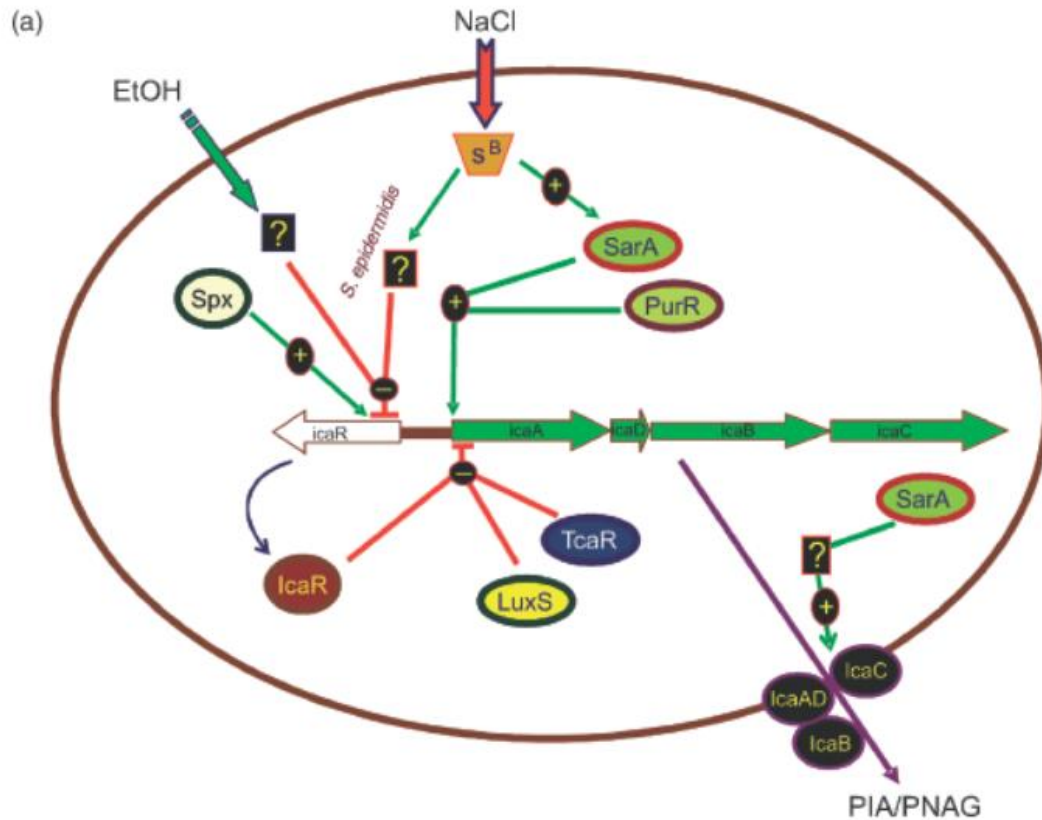
## **9. ANEXO**

**Anexo 1. Escala de patrón colorimétrico para la evaluación de agar rojo Congo tomado de Arciola et al., (2002)**



Almost black (ab), black (b), Bordeaux (brd), red (r), very black(vb), very red (vr)

**Anexo 2. Mecanismo de activación e inhibición de biofilm ica-dependiente en Estafilococos tomado de O’Gara, 2007**



Las flechas verdes indican vías reguladoras positivas y las flechas rojas indican vías reguladoras negativas.